

Πανεπιστήμιο Κρήτης Σχολή Θετικών και Τεχνολογικών Επιστημών Τμήμα Βιολογίας

# Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών

# «Μοριακή και Εφαρμοσμένη Βιολογία Φυτών –Πράσινη Βιοτεχνολογία»

Διατριβή Μεταπτυχιακού Τίτλου Ειδίκευσης

# Μελέτη της ακραιόφιλης συμπεριφοράς του λειχήνα *Pleurosticta* acetabulum σε ακραία UVB-ακτινοβολία σε σχέση με την μεταβολική του δυνατότητα να παράγει υδρογόνο

Αναστασία Κυριατζή Εργαστήριο Βιοχημείας Φυτών και Φωτοβιολογίας Επιβλέπων Καθηγητής: Καθ. Κυριάκος Κοτζαμπάσης

ΗΡΑΚΛΕΙΟ-ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2020

University of Crete Department of Biology



Postgraduate program

# Molecular and Applied Plant Biology - Green Biotechnology

Master thesis

# Study of the extremophilic behavior of the lichen *Pleurosticta* acetabulum at extreme UVB-radiation in relation to its metabolic capacity to produce hydrogen

Anastasia Kyriatzi Laboratory of Plant Biochemistry and Photobiology Supervisor: Prof. Kiriakos Kotzabasis Η εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιοχημείας Φυτών και Φωτοβιολογίας του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης υπό την επίβλεψη του καθηγητή Κυριάκου Κοτζαμπάση.

#### Τριμελείς εξεταστική επιτροπή

Κυριάκος Κοτζαμπάσης : Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης ,Τμήμα Βιολογίας. Στέργιος Πυρίντσος : Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης ,Τμήμα Βιολογίας. Παναγιώτης Σαρρής : Επικ. Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης,Τμήμα Βιολογίας.

# Ευχαριστίες

Η παρούσα εργασία διεκπεραιώθηκε με τη βοήθεια και απαραίτητη συμβολή πολλών ατόμων, τα οποία θα ήθελα να ευχαριστήσω. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον Καθηγητή Κυριάκο Κοτζαμπάση, ο οποίος με δέχτηκε στην ομάδα του εργαστηρίου του, με εμπιστεύτηκε και με καθοδηγούσε καθ' όλη τη διάρκεια της μεταπτυχιακής μου διατριβής. Επίσης, ευχαριστώ τον Καθηγητή Στέργιο Πυρίντσο, αλλά και τον Επίκουρο Καθηγητή Παναγιώτη Σαρρή, που δέχτηκαν να συμμετέχουν στην τριμελή εξεταστική επιτροπή. Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Στέργιο Πυρίντσο, τον Καθηγητή Στέργιο Πυρίντσο για τις γνώσεις και τη μεθοδολογία που μας παρείχε, όσον αφορά στους χειρισμούς των λειχήνων, αλλά και για τις επανειλημμένες δειγματοληψίες λειχήνων που πραγματοποίησε.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην ομάδα του εργαστηρίου που με βοήθησαν και μου έμαθαν διάφορες τεχνικές και πιο συγκεκριμένα στον Φανούριο Μουντουράκη, τον Γεράσιμο Τζιβρά, τον Χρόνης Μουτίδη και τον Άρη Μαραγκουδάκη.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα άτομα που με βοήθησαν σε προσωπικό επίπεδο. Κυρίως την οικογένειά μου, που εμπιστεύεται τις επιλογές μου και με στηρίζει όλα αυτά τα χρόνια, καθώς και τους φίλους μου που μου κράτησαν συντροφιά, και με στήριξαν στις δύσκολες στιγμές που προέκυψαν και μου έδωσαν δύναμη να συνεχίσω ως το τέλος.

Περίληψη	Περιεχόμενα	
Abstract.       6         1.Εισαγωγή       7         1.1.1 Η μορφολογία των λειχήνων       8         1.1.2 Η συμβίωση μυκοβιώτη και φωτοβιώτη       9         1.2 Η φωτοσυνθετική διαδικασία       13         1.4 Δυνατότητα παραγωγής υδρογόνου από λειχήνες       21         1.6 Η ακραιώφιλη συμπεριφορά των λειχήνων και αστροβιολογικές       7         προεκτάσεις       23         1.7 Ο σκοπός της παρούσας εργασίας       25         2.7λικά και μέθοδοι       26         2.1. Ο Ατιχήνας Pleurosticta acetabulum       26         2.1.1 Ο Λειχήνας Pleurosticta acetabulum       26         2.2 Τα μονοκόταρα χλωροφόκη Scenedesmus obliquus και Chlorella vulgaris         27       2.2 Πειραματικοί χειρισμοί.         28       2.3 Μέτρηση Επαγωγικού Φθορισμού       30         2.4 Ποσοτική εκτίμηση Η2 με τη χρήση GC-TCD       33         3.Αποτελέσματα       34         3.1 Έλεγχος ανθεκτικότητας του λειχήνα σε ακραία UVB ακτινοβολία       40         3.4 Δυνατότητα παραγωγής υδρογόνου από τον αναγεννημένο λειχήνα μετά την έκθεση του σε ακραία UVB ακτινοβολία       48         3.5 Έλεγχος ανθεκτικότητας του λειχήνα σε ακραία UVB ακτινοβολία σε συνδυασμό με ακραίες θερμοκρασίες       49         3.6 Δυνατότητα παραγωγής υδρογόνου από τον αναγεννημένο λειχήνα μετά την έκθεση του σε ακραία UVB ακτινοβολία       48	Περίληψη	5
1.Εισαγωγή       7         1.1.1 Η μορφολογία των λειχήνων       8         1.1.2 Η συμβίωση μυκοβιώτη και φωτοβιώτη       9         1.2 Η φωτοσυνθετική διαδικασία       13         1.4 Δυνατότητα παραγωγής υδρογόνου από λειχήνες       21         1.6 Η ακραιόφιλη συμπεριφορά των λειχήνων και αστροβιολογικές       7         προεκτάσεις       23         1.7 Ο σκοπός της παρούσας εργασίας       25         2.7λικά και μέθοδοι       26         2.1. Ο Λειχήνας Pleurosticta acetabulum       26         2.1. Ο Λειχήνας Pleurosticta acetabulum       26         2.2 Τα μονοκότταρα χλωροφόκη Scenedesmus obliquus και Chlorella vulgaris         27       2.2 Πειραματικοί χειρισμοί.         28       2.3 Μέτρηση Επαγωγικού Φθορισμού       30         2.4 Ποσοτική εκτίμηση Η2 με τη χρήση GC-TCD       33         3.Αποτελέσματα       34         3.1 Έλεγχος ανθεκτικότητας του λειχήνα σε ακραία UVB ακτινοβολία       40         3.4 Λυνατότητα παραγωγής υδρογόνου από τον αναγεννημένο λειχήνα μετά την έκθεση του σε ακραία UVB ακτινοβολία       48         3.5 Έλεγχος ανθεκτικότητας του λειχήνα σε ακραία UVB ακτινοβολία σε συνδυασμό με ακραίες θερμοκρασίες       49         3.6 Λυνατότητα παραγωγής υδρογόνου από τον αναγεννημένο λειχήνα μετά την έκθεση του σε ακραία UVB ακτινοβολία       48         3.5 Έλεγχος ανθεκτικότητας	Abstract	6
1.1.1 Η μορφολογία των λειχήνων       8         1.1.2 Η συμβίωση μυκοβιώτη και φωτοβιώτη       9         1.2 Η φωτοσυνθετική διαδικασία       13         1.4 Δυνατότητα παραγωγής υδρογόνου από χλωροφύκη       18         1.5 Φωτοσυνθετική παραγωγή υδρογόνου από λειχήνες       21         1.6 Η ακραιόφιλη συμπεριφορά των λειχήνων και αστροβιολογικές       23         προεκτάσεις       23         1.7 Ο σκοπός της παρούσας εργασίας       26         2.1.1 Ο Λευχήνας Pleurosticta acetabulum       26         2.1 Ο Λευχήνας Pleurosticta acetabulum       26         2.2 Τα μονοκύτταρα χλωροφύκη Scenedesmus obliquus και Chlorella vulgaris       27         2.2 Πειραματικοί χειρισμοί       28         2.3 Μέτρηση Επαγωγικού Φθορισμού       30         2.4 Ποσοτική εκτίμηση Η2 με τη χρήση GC-TCD       33         3.Αποτελέσματα       34         3.1 Έλεγχος ανθεκτικότητας του λειχήνα σε ακραία UVB ακτινοβολία       40         3.4 Δυνατότητα παραγωγής υδρογόνου από τον αναγευνημένο λειχήνα μετά την έκθεση του σε ακραία UVB ακτινοβολία       48         3.5 Έλεγχος ανθεκτικότητας του λειχήνα σε ακραία UVB ακτινοβολία σε συνδυαφιά με ακραίες θερμοκρασίες       49         3.6 Δυνατότητα παραγωγής υδρογόνου από τον αναγευνημένο λειχήνα σε ακραία UVB ακτινοβολία σε συνδυαφιά με ακραίες θερμοκρασίες       49         3.7 Έκθεση μονοκύτταρων χλωροφυκών σε ξη	1.Εισαγωγή	7
1.1.2 Η συμβίωση μυκοβιώτη και φωτοβιώτη       9         1.2 Η φωτοσυνθετική διαδικασία       13         1.4 Δυνατότητα παραγωγής υδρογόνου από χλωροφύκη       18         1.5 Φωτοσυνθετική παραγωγή υδρογόνου από λειχήνες       21         1.6 Η ακραιόφιλη συμπεριφορά των λειχήνων και αστροβιολογικές       23         προεκτάσεις       23         1.7 Ο σκοπός της παρούσας εργασίας       26         2.1 Οργανισμοί       26         2.1 Ο Λειχήνας Pleurosticta acetabulum       26         2.1 Ο Λειχήνας Pleurosticta acetabulum       26         2.2 Τα μονοκύτταρα χλωροφύκη Scenedesmus obliquus και Chlorella vulgaris       27         2.2 Πειραματικοί χειρισμοί       28         2.3 Μέτρηση Επαγωγικού Φθορισμού       30         2.4 Ποσοτική εκτίμηση Η2 με τη χρήση GC-TCD       33         3.Αποτελέσματα       34         3.1 Έλεγχος ανθεκτικότητας του λειχήνα σε ακραία UVB ακτινοβολία       40         3.4 Δυνατότητα παραγωγής υδρογόνου από τον αναγεινημένο λειχήνα μετά την έκθεση του σε ακραία UVB ακτινοβολία       48         3.5 Έλεγχος ανθεκτικότητας του λειχήνα σε ακραία UVB ακτινοβολία σε συνδυαφιά με ακραίες θερμοκρασίες       49         3.6 Δυνατότητα παραγωγής υδρογόνου από τον αναγεινημένο λειχήνα μετά την έκθεση του σε ακραία UVB ακτινοβολία       48         3.5 Έλεγχος ανθεκτικότητας του λειχήνα σε ακραία UVB ακτινοβολία σε συνδυαφ	1.1.1 Η μορφολογία των λειχήνων	8
1.2 Η φωτοσυνθετική διαδικασία       13         1.4 Δυνατότητα παραγωγής υδρογόνου από χλωροφύκη       18         1.5 Φωτοσυνθετική παραγωγή υδρογόνου από λειχήνες       21         1.6 Η ακραιόφιλη συμπεριφορά των λειχήνων και αστροβιολογικές       7         προεκτάσεις       23         1.7 Ο σκοπός της παρούσας εργασίας       25         2./ λικά και μέθοδοι       26         2.1. Ο ργανισμοί       26         2.1. Ο Λειχήνας Pleurosticta acetabulum       26         2.1 Ο Λειχήνας Pleurosticta acetabulum       26         2.1 Το Λειχήνας Pleurosticta acetabulum       26         2.2 Τα μονοκύτταρα χλωροφύκη Scenedesmus obliquus και Chlorella vulgaris       27         2.2 Πειραματικοί χειρισμοί       28         2.3 Μέτρηση Επαγωγικού Φθορισμού       30         2.4 Ποσοτική εκτίμηση Η2 με τη χρήση GC-TCD       33         3.Αποτελέσματα       34         3.1 Έλεγχος ανθεκτικότητας του λειχήνα σε ακραία UVB ακτινοβολία       40         3.4 Λυνατότητα παραγωγής υδρογόνου από τον αναγεννημένο λειχήνα μετά την έκθεση του σε ακραία UVB ακτινοβολία       48         3.5 Έλεγχος ανθεκτικότητας του λειχήνα σε ακραία UVB ακτινοβολία       48         3.5 Έλεγχος ανθεκτικότητας του λειχήνα σε ακραία UVB ακτινοβολία       48         3.5 Έλεγχος ανθεκτικότητας του λειχήνα σε ακραία UVB ακτινοβολία σε συνδυασμό με α	1.1.2 Η συμβίωση μυκοβιώτη και φωτοβιώτη	9
1.4 Δυνατότητα παραγωγής υδρογόνου από χλωροφύκη       18         1.5 Φωτοσυνθετική παραγωγή υδρογόνου από λειχήνες       21         1.6 Η ακραιόφιλη συμπεριφορά των λειχήνων και αστροβιολογικές       7         προεκτάσεις       23         1.7 Ο σκοπός της παρούσας εργασίας       26         2.1 Οργανισμοί       26         2.1 Ο Λειχήνας Pleurosticta acetabulum       26         2.2 Τα μονοκύτταρα χλωροφύκη Scenedesmus obliquus και Chlorella vulgaris       27         2.2 Πειραματικοί χειρισμοί       28         2.3 Μέτρηση Επαγωγικού Φθορισμού       30         2.4 Ποσοτική εκτίμηση Η2 με τη χρήση GC-TCD       33         3.Αποτελέσματα       34         3.1 Έλεγχος ανθεκτικότητας του λειχήνα σε ακραία UVB ακτινοβολία       40         3.4 Δυνατότητα παραγωγής υδρογόνου από τον αναγεννημένο λειχήνα μετά την έκθεση του σε ακραία UVB ακτινοβολία       48         3.5 Έλεγχος ανθεκτικότητας του λειχήνα σε ακραία UVB ακτινοβολία σε συνδυασμό με ακραίες θερμοκρασίες       49         3.6 Δυνατότητα παραγωγής υδρογόνου από τον αναγεννημένο λειχήνα μετά την έκθεση του σε ακραία UVB ακτινοβολία       48         3.5 Έλεγχος ανθεκτικότητας του λειχήνα σε ακραία UVB ακτινοβολία σε συνδυασμό με ακραίες θερμοκρασίες       49         3.6 Δυνατότητα παραγωγής υδρογόνου από τον ακετέθηκαν σε ακραία UVB ακτινοβολία και ακραίες θερμοκρασίες       54         3.7 Έκθεση μονοκύτταρων χλωροφυ	1.2 Η φωτοσυνθετική διαδικασία	.13
1.5 Φωτοσυνθετική παραγωγή υδρογόνου από λειχήνες       21         1.6 Η ακραιόφιλη συμπεριφορά των λειχήνων και αστροβιολογικές       23         προεκτάσεις       23         1.7 Ο σκοπός της παρούσας εργασίας       25         2.Υλικά και μέθοδοι       26         2.1 Οργανισμοί       26         2.1 Οργανισμοί       26         2.1 Ο Λειχήνας Pleurosticta acetabulum       26         2.2 Τα μονοκύτταρα χλωροφύκη Scenedesmus obliquus και Chlorella vulgaris       27         2.2 Πειραματικοί χειρισμοί.       28         2.3 Μέτρηση Επαγωγικού Φθορισμού       30         2.4 Ποσοτική εκτίμηση Η2 με τη χρήση GC-TCD       33         3.Αποτελέσματα       34         3.1 Έλεγχος ανθεκτικότητας του λειχήνα σε ακραία UVB ακτινοβολία.       40         3.4 Δυνατότητα παραγωγής υδρογόνου από τον αναγεννημένο λειχήνα μετά την έκθεση του σε ακραία UVB ακτινοβολία       48         3.5 Έλεγχος ανθεκτικότητας του λειχήνα σε ακραία UVB ακτινοβολία σε συνδυασμό με ακραίες θερμοκρασίες.       49         3.6 Δυνατότητα παραγωγής υδρογόνου από τον αναγεννημένο λειχήνα σε ακραία UVB ακτινοβολία σε συνδυασμό με ακραίες θερμοκρασίες.       54         3.7 Έκθεση μονοκύτταρων χλωροφυκών σε ξηρασία και υψηλής έντασης UVB ακτινοβολία       56         4. Συζήτηση       58	1.4 Δυνατότητα παραγωγής υδρογόνου από χλωροφύκη	.18
1.6 Η ακραιόφιλη συμπεριφορά των λειχήνων και αστροβιολογικές         προεκτάσεις	1.5 Φωτοσυνθετική παραγωγή υδρογόνου από λειχήνες	.21
προεκτάσεις	1.6 Η ακραιόφιλη συμπεριφορά των λειχήνων και αστροβιολογικές	
1.7 Ο σκοπός της παρούσας εργασίας	προεκτάσεις	.23
2.Υλικά και μέθοδοι       26         2.1. Οργανισμοί       26         2.1.1 Ο Λειχήνας Pleurosticta acetabulum       26         2.2 Τα μονοκύτταρα χλωροφύκη Scenedesmus obliquus και Chlorella vulgaris       27         2.2 Τα μονοκύτταρα χλωροφύκη Scenedesmus obliquus και Chlorella vulgaris       27         2.2 Πειραματικοί χειρισμοί       28         2.3 Μέτρηση Επαγωγικού Φθορισμού       30         2.4 Ποσοτική εκτίμηση Η2 με τη χρήση GC-TCD       33         3.Αποτελέσματα       34         3.1 Έλεγχος ανθεκτικότητας του λειχήνα σε ακραία UVB ακτινοβολία       34         3.2 Δυνατότητα παραγωγής υδρογόνου από τον λειχήνα μετά την έκθεση του σε ακραία UVB ακτινοβολία       40         3.4 Δυνατότητα παραγωγής υδρογόνου από τον αναγεννημένο λειχήνα μετά την έκθεση του σε ακραία UVB ακτινοβολία       48         3.5 Έλεγχος ανθεκτικότητας του λειχήνα σε ακραία UVB ακτινοβολία σε συνδυασμό με ακραίες θερμοκρασίες       49         3.6 Δυνατότητα παραγωγής υδρογόνου από λειχήνες που εκτέθηκαν σε ακραία UVB ακτινοβολία και ακραίες θερμοκρασίες       54         3.7 Έκθεση μονοκύτταρων χλωροφυκών σε ξηρασία και υψηλής έντασης UVB ακτινοβολία       56         4. Συζήτηση       58         5. Βιβλιογραφία       62	1.7 Ο σκοπός της παρούσας εργασίας	.25
2.1. Οργανισμοί       26         2.1.1 Ο Λειχήνας Pleurosticta acetabulum       26         2.2 Τα μονοκύτταρα χλωροφύκη Scenedesmus obliquus και Chlorella vulgaris       27         2.2 Τα μονοκύτταρα χλωροφύκη Scenedesmus obliquus και Chlorella vulgaris       27         2.2 Πειραματικοί χειρισμοί       28         2.3 Μέτρηση Επαγωγικού Φθορισμού       30         2.4 Ποσοτική εκτίμηση Η2 με τη χρήση GC-TCD       33         3.Αποτελέσματα       34         3.1 Έλεγχος ανθεκτικότητας του λειχήνα σε ακραία UVB ακτινοβολία       34         3.2 Δυνατότητα παραγωγής υδρογόνου από τον αναγεννημένο λειχήνα μετά την έκθεση του σε ακραία UVB ακτινοβολία       40         3.4 Δυνατότητα παραγωγής υδρογόνου από τον αναγεννημένο λειχήνα μετά την έκθεση του σε ακραία UVB ακτινοβολία       48         3.5 Έλεγχος ανθεκτικότητας του λειχήνα σε ακραία UVB ακτινοβολία σε συνδυασμό με ακραίες θερμοκρασίες       49         3.6 Δυνατότητα παραγωγής υδρογόνου από λειχήνες που εκτέθηκαν σε ακραία UVB ακτινοβολία σε συνδυασμό με ακραίες θερμοκρασίες       54         3.7 Έκθεση μονοκύτταρων χλωροφυκών σε ξηρασία και υψηλής έντασης UVB ακτινοβολία       56         4. Συζήτηση       58	2.Υλικά και μέθοδοι	.26
2.1.1 Ο Λειχήνας Pleurosticta acetabulum       26         2.2 Τα μονοκύτταρα χλωροφύκη Scenedesmus obliquus και Chlorella vulgaris       27         2.2 Πειραματικοί χειρισμοί.       28         2.3 Μέτρηση Επαγωγικού Φθορισμού       30         2.4 Ποσοτική εκτίμηση Η2 με τη χρήση GC-TCD.       33         3.Αποτελέσματα       34         3.1 Έλεγχος ανθεκτικότητας του λειχήνα σε ακραία UVB ακτινοβολία.       34         3.2 Δυνατότητα παραγωγής υδρογόνου από τον λειχήνα μετά την έκθεση του σε ακραία UVB ακτινοβολία.       40         3.4 Δυνατότητα παραγωγής υδρογόνου από τον αναγεννημένο λειχήνα μετά την έκθεση του σε ακραία UVB ακτινοβολία.       40         3.5 Έλεγχος ανθεκτικότητας του λειχήνα σε ακραία UVB ακτινοβολία σε συνδυασμό με ακραίες θερμοκρασίες.       49         3.6 Δυνατότητα παραγωγής υδρογόνου από λειχήνες που εκτέθηκαν σε ακραία UVB ακτινοβολία σε συνδυασμό με ακραίες θερμοκρασίες.       54         3.7 Έκθεση μονοκύτταρων χλωροφυκών σε ξηρασία και υψηλής έντασης UVB ακτινοβολία.       56         4. Συζήτηση       58	2.1. Οργανισμοί	.26
2.2 Τα μονοκύτταρα χλωροφύκη       Scenedesmus obliquus και Chlorella vulgaris         27       2.2 Πειραματικοί χειρισμοί       28         2.3 Μέτρηση Επαγωγικού Φθορισμού       30         2.4 Ποσοτική εκτίμηση Η2 με τη χρήση GC-TCD       33         3.Αποτελέσματα       34         3.1 Έλεγχος ανθεκτικότητας του λειχήνα σε ακραία UVB ακτινοβολία       34         3.2 Δυνατότητα παραγωγής υδρογόνου από τον λειχήνα μετά την έκθεση του σε ακραία UVB ακτινοβολία       40         3.4 Δυνατότητα παραγωγής υδρογόνου από τον αναγεννημένο λειχήνα μετά την έκθεση του σε ακραία UVB ακτινοβολία       40         3.5 Έλεγχος ανθεκτικότητας του λειχήνα σε ακραία UVB ακτινοβολία σε συλδυαυμό μετα παραγωγής υδρογόνου από τον αναγεννημένο λειχήνα μετά την έκθεση του σε ακραία UVB ακτινοβολία       48         3.5 Έλεγχος ανθεκτικότητας του λειχήνα σε ακραία UVB ακτινοβολία σε συλδυαυμό με τα κραίες θερμοκρασίες       54         3.7 Έκθεση μονοκύτταρων χλωροφυκών σε ξηρασία και υψηλής έντασης UVB ακτινοβολία       56         4. Συζήτηση       58	2.1.1 Ο Λειχήνας Pleurosticta acetabulum	.26
27 2.2 Πειραματικοί χειρισμοί	2.2 Τα μονοκύτταρα χλωροφύκη Scenedesmus obliquus και Chlorella vulgar	is
2.2 Πειραματικοί χειρισμοί		.27
2.3 Μέτρηση Επαγωγικού Φθορισμού       30         2.4 Ποσοτική εκτίμηση H2 με τη χρήση GC-TCD       33         3.Αποτελέσματα       34         3.1 Έλεγχος ανθεκτικότητας του λειχήνα σε ακραία UVB ακτινοβολία       34         3.2 Δυνατότητα παραγωγής υδρογόνου από τον λειχήνα μετά την έκθεση του σε ακραία UVB ακτινοβολία       40         3.4 Δυνατότητα παραγωγής υδρογόνου από τον αναγεννημένο λειχήνα μετά την έκθεση του σε ακραία UVB ακτινοβολία       40         3.5 Έλεγχος ανθεκτικότητας του λειχήνα σε ακραία UVB ακτινοβολία σε συνδυασμό με ακραίες θερμοκρασίες       49         3.6 Δυνατότητα παραγωγής υδρογόνου από λειχήνες που εκτέθηκαν σε ακραία UVB ακτινοβολία και ακραίες θερμοκρασίες       54         3.7 Έκθεση μονοκύτταρων χλωροφυκών σε ξηρασία και υψηλής έντασης UVB ακτινοβολία       56         4. Συζήτηση       58         5. Βιβλιογραφία       62	2.2 Πειραματικοί χειρισμοί	.28
2.4 Ποσοτική εκτίμηση H2 με τη χρήση GC-TCD       33         3.Αποτελέσματα       34         3.1 Έλεγχος ανθεκτικότητας του λειχήνα σε ακραία UVB ακτινοβολία       34         3.2 Δυνατότητα παραγωγής υδρογόνου από τον λειχήνα μετά την έκθεση του σε ακραία UVB ακτινοβολία       40         3.4 Δυνατότητα παραγωγής υδρογόνου από τον αναγεννημένο λειχήνα μετά την έκθεση του σε ακραία UVB ακτινοβολία       40         3.5 Έλεγχος ανθεκτικότητας του λειχήνα σε ακραία UVB ακτινοβολία       48         3.5 Έλεγχος ανθεκτικότητας του λειχήνα σε ακραία UVB ακτινοβολία σε συνδυασμό με ακραίες θερμοκρασίες       49         3.6 Δυνατότητα παραγωγής υδρογόνου από λειχήνες που εκτέθηκαν σε ακραία UVB ακτινοβολία και ακραίες θερμοκρασίες       54         3.7 Έκθεση μονοκύτταρων χλωροφυκών σε ξηρασία και υψηλής έντασης UVB ακτινοβολία       56         4. Συζήτηση       58         5. Βιβλιογραφία       62	2.3 Μέτρηση Επαγωγικού Φθορισμού	.30
3.Αποτελέσματα	2.4 Ποσοτική εκτίμηση Η2 με τη χρήση GC-TCD	.33
<ul> <li>3.1 Έλεγχος ανθεκτικότητας του λειχήνα σε ακραία UVB ακτινοβολία</li></ul>	3.Αποτελέσματα	.34
3.2 Δυνατότητα παραγωγής υδρογόνου από τον λειχήνα μετά την έκθεση του       40         3.4 Δυνατότητα παραγωγής υδρογόνου από τον αναγεννημένο λειχήνα μετά την       40         3.4 Δυνατότητα παραγωγής υδρογόνου από τον αναγεννημένο λειχήνα μετά την       40         3.5 Έλεγχος ανθεκτικότητας του λειχήνα σε ακραία UVB ακτινοβολία	3.1 Έλεγχος ανθεκτικότητας του λειχήνα σε ακραία UVB ακτινοβολία	.34
3.4 Δυνατότητα παραγωγής υδρογόνου από τον αναγεννημένο λειχήνα μετά την έκθεση του σε ακραία UVB ακτινοβολία	3.2 Δυνατότητα παραγωγής υδρογόνου από τον λειχήνα μετά την έκθεση του σε ακραία UVB ακτινοβολία	) .40
<ul> <li>3.5 Έλεγχος ανθεκτικότητας του λειχήνα σε ακραία UVB ακτινοβολία σε συνδυασμό με ακραίες θερμοκρασίες</li></ul>	3.4 Δυνατότητα παραγωγής υδρογόνου από τον αναγεννημένο λειχήνα μετά τ έκθεση του σε ακραία UVB ακτινοβολία	<b>την</b> .48
3.6 Δυνατότητα παραγωγής υδρογόνου από λειχήνες που εκτέθηκαν σε ακραία UVB ακτινοβολία και ακραίες θερμοκρασίες	3.5 Έλεγχος ανθεκτικότητας του λειχήνα σε ακραία UVB ακτινοβολία σε συνδυασμό με ακραίες θερμοκρασίες	.49
<ul> <li>3.7 Έκθεση μονοκύτταρων χλωροφυκών σε ξηρασία και υψηλής έντασης UVB ακτινοβολία</li></ul>	3.6 Δυνατότητα παραγωγής υδρογόνου από λειχήνες που εκτέθηκαν σε ακρα UVB ακτινοβολία και ακραίες θερμοκρασίες	ία .54
<ul> <li>4. Συζήτηση</li></ul>	3.7 Έκθεση μονοκύτταρων χλωροφυκών σε ξηρασία και υψηλής έντασης UV ακτινοβολία	<b>VB</b> .56
5. Βιβλιογραφία	4. Συζήτηση	.58
	5. Βιβλιογραφία	.62

# Περίληψη

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η ακραιόφιλη συμπεριφορά του λειχήνα Pleurosticta acetabulum σε ακραίες εντάσεις UVB ακτινοβολίας  $(1.7 \text{mW/cm}^2 = 1000)$ J/m<sup>2</sup>.min) για μεγάλα χρονικά διαστήματα (4, 20 και 70 ώρες) και η δυνατότητα να διατηρήσει την μεταβολική του ικανότητα να παράγει υδρογόνο (H<sub>2</sub>). Ο λειγήνας είναι ένα ιδιαίτερο μικρό-οικοσύστημα που αποτελείται από ένα μύκητα και ένα χλωροφύκος ή κυανοβακτήριο. Η συμβίωση αυτή προσφέρει πλεονεκτήματα και στους δύο συμβιωτές. Ο μύκητας διοχετεύει νερό στον φωτοσυνθετικό οργανισμό του γλωροφύκους, το οποίο ως αντάλλαγμα παρέχει χημική ενέργεια μέσω της διαδικασίας της φωτοσύνθεσης. Η ιδιαιτερότητά αυτού του συμβιωτικού συστήματος είναι η ικανότητα του να αποβάλλει όλη την υγρασία του και να μένει σε μία ανενεργή κατάσταση ώστε να προστατεύεται από δυσμενείς συνθήκες. Οι πειραματικές προσεγγίσεις της παρούσας εργασίας μας απέδειξαν ξεκάθαρα την ικανότητά επιβίωσης του λειχήνα κατά την έκθεση του σε ακραία UVB ακτινοβολία για μεγάλο χρονικό διάστημα, τόσο σε αφυδατωμένη όσο και σε αναγεννημένη (πλήρως ενεργή) μορφή. Η βιωσιμότητα του ελέγχθηκε με την μέθοδο επαγωγικού φθορισμού (OJIP test) η οποία καταγράφει τις αλλαγές της μοριακής δομής και λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηγανισμού. Βάσει των αποτελεσμάτων της αέριας γρωματογραφίας θερμικής αγωγιμότητας (GC-TCD) για τον προσδιορισμό της παραγωγής υδρογόνου, αποδείχθηκε ότι παρά τις υψηλές εντάσεις UVB ακτινοβολίας που δέχθηκε ο λειχήνας διατήρησε πλήρως την ικανότητα του να παράγει μεγάλες ποσότητες μοριακού υδρογόνου μετά την ακραία καταπόνηση και χωρίς την προσθήκη οποιασδήποτε οργανικής ένωσης. Συνδυαστική έκθεση του λειχήνα σε υψηλής έντασης UVB ακτινοβολία, συνθήκες κενού (~10 mbar για 24 ώρες) και ακραίες θερμοκρασίες (-196°C και +70°C) ανέδειξαν την πολύ-ακραιόφιλη συμπεριφορά του. Ο λειχήνας παρέμεινε ουσιαστικά ανεπηρέαστος και επανήλθε πλήρως, όταν άλλαξαν οι συνθήκες (αναγέννηση στο νερό), διατηρώντας στο ακέραιο την ικανότητα του να παράγει μεγάλες ποσότητες υδρογόνου μόνο με την προσθήκη νερού σε ένα κλειστό σύστημα. Το υδρογόνο είναι ένα πολλά υποσγόμενο καύσιμο του μέλλοντος, και αυτή η ικανότητα του συμβιωτικού μικρο-οικοσυστήματος του λειχήνα να αντέχει σε ακραία αντίξοες συνθήκες και να παράγει μεγάλες ποσότητες υδρογόνου, χωρίς την απαίτηση πρόσθετης ενέργειας, επιτρέπει τη χρήση των λειχήνων για μελλοντικές βιοτεχνολογικές εφαρμογές ακόμη και σε ακραία περιβάλλοντα άλλων πλανητών, όπως του Άρη, ανοίγοντας το δρόμο για αστροβιολογικές και αστροβιοτεχνολογικές εφαρμογές.

# Abstract

The purpose of this work is to demonstrate the extremophilic behavior of the lichen *Pleurosticta acetabulum* at extreme UVB radiation (1.7 mW/cm<sup>2</sup>= 1000 J/m<sup>2</sup>.min) for various time periods (4, 20 & 70h) maintaining its metabolic capacity to produce hydrogen (H<sub>2</sub>). Lichen is a special micro-ecosystem, which consisted of a fungus and a green alga or cyanobacterium. The fungus offers water to photosynthetic organism, which in exchange provides chemical energy through photosynthesis. The particularity of this symbiotic system is its ability to remove (all) moisture and to remain in an inactive state in order to be protected from extreme conditions. The results of this project prove the ability of lichen to survive under extreme UVB radiation for long time, both in dehydrated and in regenerated form. The lichen viability was tested using fluorescence induction techniques (OJIP-test), which records changes in molecular structure and function of the photosynthetic mechanism. Based on the results of gas chromatography, using thermal conductivity detector (GC-TCT), it is demonstrated that the lichen can retain its ability to produce large amount of molecular hydrogen when it exposed in high intensities of UVB radiation. Furthermore, combined expose of lichen to high intensity of UVB radiation, vacuum conditions (10 mbar for 24 hours) and extreme temperatures (-196°C and +70°C) highlighted its poly-extremophilic behavior. The lichen remain substantially unaffected and recovered completely when condition changed (regeneration in water) maintaining its ability to produce large amount of hydrogen only by adding water in a close system. Hydrogen is a promising fuel for the future and this ability of the lichen micro-ecosystem to withstand extreme conditions and to produce large amount of hydrogen, without the need of additional energy, allows the use of lichens for future biotechnological applications even in extreme environments of other planets, such as Mars, paving the way for astrobiological and astrobiotechnological applications.

# 1.Εισαγωγή

# 1.1 Λειχήνες ως "έξυπνα" μικρο-οικοσυστήματα

Οι λειχήνες είναι συμβιωτικοί οργανισμοί που αποτελούνται κατά κύριο λόγο από έναν μύκητα και ένα χλωροφύκος ή κυανοβακτήριο (Εικόνα 1.1). Οι μύκητες που συμμετέχουν είναι κυρίως του γένους Ascomycota και σπανιότερα Basidiomycota και αποτελούν τον μυκοβιώτη του συστήματος, ενώ ο φωτοβιώτης είναι ο φωτοσυνθετικός οργανισμός που μπορεί να είναι ένα χλωροφύκος ή ένα κυανοβακτήριο (Honegger, 1998). Σε ένα μικρο-οικοσύστημα λειχήνα μπορούν να συμμετέχουν και άλλοι οργανισμοί, όπως ζυμομύκητες, οι οποίοι όμως δεν είναι απαραίτητοι για την επιβίωση του λειχήνα, αλλά σε κάποια είδη λειχήνων είναι υπεύθυνοι για την σύνθεση ορισμένων χημικών ενώσεων (Spribille et al, 2016).



**Εικόνα 1.1:** Μικροσκοπική απεικόνιση λειχήνα. Με πράσινο χρώμα φαίνεται ο φωτοβιώτης (trebouxia) και με γκρι ο μυκοβιώτης. (http://www.bioref.lastdragon.org/Chlorophyta/Trebouxia.html)

Ο λειχήνας παρουσιάζει εκλεκτικότητα ως προς τον φωτοβιώτη, από τον οποίο εξασφαλίζει την πηγή άνθρακα για την επιβίωση του μέσω της φωτοσύνθεσης, ενώ ο μύκητας δημιουργεί ένα μικροπεριβάλλον, που προστατεύει τον φωτοβιώτη σε συνθήκες ακραίας καταπόνησης. Για αυτόν τον λόγο έχουν την ικανότητα να μεταβαίνουν σε μία ανενεργή κατάσταση (Kranner 2003) ώστε να προστατεύονται από δυσμενείς συνθήκες όπως απόλυτη ξηρασία και ακραίες θερμοκρασίες (Kappen 1973;

Beckett 2008; Parasyri et al. 2019). Σε αυτό πιθανόν να συμβάλει το γεγονός ότι οι λειχήνες είναι πλούσιοι σε αλκοόλες σακχάρου, οι οποίες θεωρείται ότι αποτελούν τη βάση της αξιοσημείωτης ανοχής τους στην απόλυτη ξηρασία (Kappen and Valladares 1999). Το πιο κοινό είδος φωτοβιώτη που συναντάται σε λειχήνες, ακόμη και σε ακραία περιβάλλοντα, όπως αυτά της Ανταρκτικής και των Άλπεων, ανήκει στο γένος *Trebouxia* (Tschermak-Woess 1988). Αυτό το είδος φωτοβιώτη δεν είναι αρκετά ανταγωνιστικό για να επιβιώσει στη μη-συμβιωτική κατάσταση. Μαζί με το μύκητα, όμως, μπορεί να αποικίσει οικοσυστήματα που θα ήταν αδύνατο να βρεθεί μόνο του. Οι μέχρι τώρα μελέτες έχουν δείξει ότι όταν τα δύο κύρια μέρη που βρίσκονται σε συμβίωση είναι πιο ανθεκτικά σε σχέση με το αν ο μύκητας ή το χλωροφύκος/κυανοβακτήριο βρίσκονταν μόνα τους σε ακραίες συνθήκες (de Vera 2012).

#### 1.1.1 Η μορφολογία των λειχήνων

Η μορφή των λειχήνων ποικίλει τόσο σε χρώμα όσο σε μέγεθος και σχήμα. Οι αποχρώσεις που συναντιούνται είναι πράσινο, κόκκινο, πορτοκαλί, κίτρινο, γκρι, καφέ και μαύρο (Brodo et al. 2001).

Το βλαστικό τμήμα του λειχήνας είναι ο θαλλός, όπως φαίνεται στην διπλανή εικόνα (εικόνα 1.2). Ο φλοιός (upper cortex) είναι το εξωτερικό του στρώμα και αποτελείται από παχύτερα κύτταρα που είναι πυκνά στοιβαγμένα. Αυτό το στρώμα παρέχει ένα μέτρο προστασίας και χρώμα σε ορισμένα είδη. Στο επόμενο στρώμα βρίσκεται ο



Εικόνα 1.2: Η διατομή του θαλλού του λειχήνα που δείχνει τα διάφορα συστατικά του. Ο ανώτερος φλοιός των μυκητιακών υφών παρέχει προστασία (cortex). Η φωτοσύνθεση εμφανίζεται στη ζώνη των χλωροφυκών (algal zone). Η ζώνη medulla αποτελείται από μυκητιακές υφές. Ο κατώτερος φλοιός (lower cortex) παρέχει επίσης προστασία. Τα ριζοειδή (rhizines) αγκυροβολούν τον θαλλό στο υπόστρωμα.(ANPA,2001).

φωτοβιώτης του συστήματος (algal layer) και

στην συνέχεια η ζώνη medulla, που αποτελείται από μυκιλιακές υφές που

περικλείονται από τον εξωτερικό φλοιό (lower cortex). Τα ριζωειδή (rihzines) είναι μυκηλιακές ίνες που εκτείνονται από την medulla και συνδέουν το λειχήνα στο υπόστρωμά του. Τα ριζωειδή δεν έχουν αγγειακές ικανότητες όπως οι ρίζες στα φυτά, ούτε μεταφέρουν νερό ή θρεπτικά συστατικά στον λειχήνα. Συμβάλλουν στη συγκράτηση του λειχήνα επάνω στο υπόστρωμα το οποίο συνήθως είναι δέντρα, βράχοι και χώμα. Η σύνδεση υποστρώματος των λειχήνων εξαρτάται από pH του φλοιού, την ικανότητα συγκράτησης νερού, την υφή του υποστρώματος, την περιεκτικότητα σε θρεπτικά συστατικά και την θερμοκρασία.

Η ταξινόμηση των λειχήνων αφορά την ανάπτυξη, την δομή τους, και τη φυσιολογία τους (μορφή), καθώς και τον τρόπο προσκόλλησης τους στο υπόστρωμα του. Η μορφολογία του θαλλού επηρεάζεται έντονα από τον φωτοβιώτη και την άμεση επαφή του με τον μυκοβιώτη. Με βάση την μορφολογία τους χωρίζονται σε τρεις ομάδες: την crustose, την foliose και την fruticose, όπως φαίνονται στην εικόνα 1.3.



Εικόνα 1.3: Οι τρεις κατηγορίες λειχήνων και τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά. Σε κάθε περίπτωση το χλωροφύκος φαίνεται να περιβάλλεται από δομές του μυκοβιώτη, ώστε να προστατεύεται από περιβαλλοντικές καταπονήσεις (https://www.earthlife.net/lichens/lichen.html)

### 1.1.2 Η συμβίωση μυκοβιώτη και φωτοβιώτη

Γενικά, οι λειχήνες υπάρχουν ως διακριτοί θαλλοί που αποτελούνται από τον φωτοβιώτη και τον μυκοβιώτη (εικόνα 1.4). Οι λειχήνες θεωρούνται ως παράδειγμα ελεγχόμενου παρασιτισμού, επειδή ο μύκητας φαίνεται να λαμβάνει περισσότερα οφέλη. Ο φωτοβιώτης αναπτύσσεται πιο αργά όταν βρίσκεται στην κατάσταση του

λειχήνα συγκριτικά με το όταν ζει ελεύθερος (Ahmadjian 1993), ενώ οι απομονωμένοι μυκοβιώτες αναπτύσσονται τόσο αργά όταν βρίσκονται μόνοι τους, που είναι απίθανο να επιβιώσουν λόγω ανταγωνισμού με άλλους μύκητες. Έτσι, η συμβίωση στα πλαίσια ενός λειχήνα είναι πολύ επιτυχημένη καθώς οι λειχήνες βρίσκονται σχεδόν σε όλους τους χερσαίους οικοτόπους, από τροπικές έως τις πολικές περιοχές. Σίγουρα ως αποτέλεσμα της συμβίωσης, οι δύο αυτοί οργανισμοί έχουν επεκταθεί σε πολλά ενδιαιτήματα, όπου χωριστά θα ήταν σπάνιο ως και αδύνατο να βρεθούν. Για παράδειγμα, τα περισσότερα χλωροφύκη και κυανοβακτήρια που ζουν ελεύθερα εμφανίζονται σε υδρόβια περιβάλλοντα ή τουλάχιστον πολύ υγρά χερσαία ενδιαιτήματα, αλλά ως μέρος των λειχήνων εμφανίζονται άφθονα σε βιότοπους που είναι συχνά ξηροί.

Επίσης, ο μύκητας από την συμβίωση βελτιώνει την πρόσληψη νερού λόγω του χαμηλού δυναμικού νερού και μειώνει ουσιαστικά την ένταση του φωτός στην οποία εκτίθεται ο φωτοβιώτης, προστατεύοντας τον από την φωτοαναστολή (Ertl 1951). Η υψηλή ένταση φωτός επηρεάζει δυσμενώς τον φωτοσυνθετικό οργανισμό (Demmig A. et al. 1990), και ως εκ τούτου η λειχηνοποίηση είναι ένας μηχανισμός με τον οποίο μπορούν τα χλωροφύκη να επεκταθούν σε περιβάλλοντα υψηλού φωτισμού.



**Εικόνα 1.4:** Οι μυκητιακές υφές γύρω από τα τα κύτταρα του φωτοβιότη σε μικροσκοπικό επίπεδο.(<u>http://biology-pictures.blogspot.com/2011/11/lichen-anatomy.html</u>)

Επιπλέον, οι λειχήνες έχουν την αξιοσημείωτη ικανότητα να εξάγουν κάποια υγρασία από μη κορεσμένο αέρα υπό συνθήκες χαμηλών θερμοκρασιών και υψηλών υγρασιών. Επιπροσθέτως, μπορούν να κάνουν χρήση διαφόρων μορφών πηγών νερού, όπως ομίχλη, δροσιά και υγρασία από ακόρεστο αέρα. Οι λειχήνες δεν έχουν κηρώδη επιδερμίδα σαν τα φυτά οπότε δεν μπορούν να εξοικονομήσουν νερό κατά τις περιόδους ξηρασίας. Για αυτό έχουν την ικανότητα να αλλάζουν την περιεκτικότητα τους σε νερό με βάση το περιβάλλον τους με παθητικό τρόπο. Όταν οι λειχήνες είναι υγρές, «ενεργοποιούνται» και αρχίζουν να φωτοσυνθέτουν και να αναπτύσσονται. Όταν οι λειχήνες είναι ξηρές, γίνονται εύθραυστες και «απενεργοποιούνται». Αυτή η διαδικασία είναι γνωστή ως "poikilohydry".

#### 1.1.2.1 Ο Φωτοβιώτης

Η επίδρασης του φωτοβιώτη στη μορφογένεση των λειχήνων είναι σημαντική, διότι μόνο μετά την καθιέρωση της συμβίωσης είναι χαρακτηριστικός ο θαλλός του λειχήνα που αναπτύχθηκε. Περίπου 40 γένη χλωροφυκών και κυανοβακτήρια έχουν αναφερθεί ως φωτοβιώτες σε λειχήνες (Tschermak-Woess 1988; Büdel 1992). Τρία από αυτά, Trebouxia, Trentepohlia και Nostoc, είναι οι πιο συχνοί φωτοβιώτες (Εικόνα 1.5). Τα γένη Trebouxia και Trentepohlia είναι ευκαρυωτικά χλωροφύκη, ενώ το γένος Nostoc ανήκει στα κυανοβακτήρια.





Η μεταφορά μεταβολιτών από τον αυτοτροφικό φωτοβιώτη στο ετεροτροφικό μυκοβιώτη εξαρτάται από τον τύπο του σχετικού φωτοβιώτη. Σε λειχήνες με χλωροφύκη, οι υδατάνθρακες είναι συνήθως αλκοόλες σακχάρου, ενώ σε λειχήνες με κυανοβακτήρια είναι γλυκόζη (Feige and Jensen 1992). Επίσης, ο τρόπος ενεργοποίησης της πρόσληψης CO<sub>2</sub> είναι ένα άλλο βασικό χαρακτηριστικό που ποικίλλει ανάλογα με το αν ο φωτοβιώτης είναι προκαρυωτικός ή ευκαρυωτικός. Σε πολλούς λειχήνες με χλωροφύκη, η καθαρή φωτοσύνθεση είναι δυνατή μόνο μετά την πρόσληψη υδρατμών κάτι που δεν συμβαίνει σε λειχήνες με κυανοβακτήρια. Για αυτόν

τον λόγο, λειχήνες με χλωροφύκη συναντιόνται κυρίως σε εύκρατα τροπικά δάση (Lange et al. 1986).

#### 1.1.2.2 Ο Μυκοβιώτης

Οι μύκητες που συμμετέχουν είναι κυρίως του γένους Ascomycota και σπανιότερα Basidiomycota (Honegger, 1998). Οι μυκοβιώτες σχηματίζουν αποικίες που μοιάζουν με θαλλούς και το κεντρικό και μικροαερόβιο μέρος αυτών, ο αποσυμβιωτικός θαλλός, αποτελείται συνήθως από κύτταρα, ενώ η νηματοειδής ανάπτυξη, δηλαδή οι εναέριες υφές, σχηματίζονται στην περιφέρεια.

Όπως όλοι οι οργανισμοί, έτσι και οι λειχήνες χρειάζονται θρεπτικά συστατικά για να επιβιώσουν και να αναπτυχθούν. Τα κύρια θρεπτικά συστατικά που χρειάζονται είναι άζωτο, άνθρακας και οξυγόνο. Οι μύκητες, ως ετερότροφοι οργανισμοί, έχουν αναπτύξει διάφορες στρατηγικές για την απόκτηση άνθρακα. Η λειχηνοποίηση, δηλαδή η απόκτηση σταθερού άνθρακα από χλωροφύκη ή κυανοβακτήρια, είναι ένας κοινός και διαδεδομένος τρόπος διατροφής.

Οι μύκητες των λειχήνων μπορούν να αναπαραχθούν τόσο αγενώς όσο και εγγενώς. Οι περισσότεροι λειχήνες αναπαράγονται αγενώς, δηλαδή όταν οι συνθήκες είναι ευνοϊκές, απλώς θα επεκταθούν σε όλη την επιφάνεια του βράχου ή του δέντρου. Σε ξηρές συνθήκες γίνονται εύθραυστοι και μικρά κομμάτια σπάζουν και διασκορπίζονται με τον άνεμο. Οι μύκητες των λειχήνων μπορούν να αναπαραχθούν και σεξουαλικά παράγοντας σπόρια. Αυτά τα σπόρια, ασκοσπόρια (Ascomycota) ή βασιδιοσπόρια (Basidiomycota), πρέπει να συναντηθούν με χλωροφύκος ή κυανοβακτήριο για να σχηματίσουν ένα νέο λειχήνα. Τέλος οι λειχήνες έχουν την δυνατότητα διασποράς μεγάλων αποστάσεων λόγω της ανοχής τους σε συνθήκες καταπόνησης και του μικροσκοπικού μεγέθους των σπορίων τους.

Φαίνεται ότι οι περισσότεροι λειχήνες έχουν ιδιαίτερη προτίμηση στην επιλογή του φωτοβιώτη τους (Beck et al.1998; Rambold et al. 1998). Όλα τα παραπάνω τονίζουν ότι παρά το μεγάλο εύρος μυκήτων και πολλών ειδών χλωροφυκών και κυανοβακτηρίων, η συμβίωση λειχήνων δεν είναι μια σχέση μεταξύ τυχαίων συνεργατών, αλλά είναι συντονισμένη με τις περιβαλλοντικές πιέσεις που επικρατούν (Werth, 2011).

#### 1.2 Η φωτοσυνθετική διαδικασία

Η φωτοσύνθεση είναι μια σημαντική και πολύπλοκη φυσικοχημική διαδικασία η οποία εξασφαλίζει τη ζωή στον πλανήτη, αφού μέσω της φωτοσύνθεσης επιτυγχάνεται η μετατροπή της ηλιακής ενέργειας σε χημική και με τη σειρά της επενδύεται στη μετατροπή της ανόργανης ύλης σε οργανική. Στα φυτά, στα χλωροφύκη, καθώς επίσης και σε ορισμένα βακτήρια (Frenkel 1954), η φωτοσυνθετική διαδικασία έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση μοριακού οξυγόνου και τη δέσμευση ατμοσφαιρικού CO<sub>2</sub>, το οποίο χρησιμοποιείται για την σύνθεση υδατανθρακικών ενώσεων (οξυγονική φωτοσύνθεση). Η φωτοσύνθεση στα φυτά έχει δύο διακριτά στάδια (Arnon 1954; Arnon 1971). Το πρώτο στάδιο είναι οι φωτεινές αντιδράσεις, στις οποίες λαμβάνει χώρα η απορρόφηση του φωτός, η μεταφορά της ενέργειας στα κέντρα αντίδρασης, καθώς και οι αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων και πρωτονίων, οι οποίες οδηγούν στην παραγωγή NADPH και ATP. Το δεύτερο στάδιο αφορά στις σκοτεινές αντιδράσεις, οι οποίες περιλαμβάνουν την αναγωγή του CO<sub>2</sub> και τη σύνθεση υδατανθράκων, χρησιμοποιώντας το NADPH και το ATP που παράγεται κατά τις φωτεινές αντιδράσεις.

#### 1.2.1. Η δομική συγκρότηση του χλωροπλάστη

Ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός εντοπίζεται χωροταξικά στους χλωροπλάστες οι οποίοι βρίσκονται σε όλους τους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς. Πρόκειται για υποκυτταρικά οργανίδια που χαρακτηρίζονται από φακοειδές σχήμα και οι διαστάσεις τους κυμαίνονται από 3 έως 6 μm. Η δομή τους περιβάλλεται από διπλή μεμβράνη που ονομάζεται πλαστιδιακός φάκελος και ο εσωτερικός χώρος στρώμα. Στο στρώμα υπάρχει ένα ανεπτυγμένο σύστημα μεμβρανών, το οποίο αποτελεί συνέχεια της εσωτερικής μεμβράνης του πλαστιδιακού φακέλου. Οι αναδιπλώσεις αυτές ονομάζονται ελασμάτια ή lamellae. Σε κανονικά διαστήματα, τα ελασμάτια διαπλατύνονται και δημιουργούν μεμβρανώδεις σάκκους, τα θυλακοειδή, που περιέχουν ένα εσωτερικό χώρο, γνωστό ως lumen ή μικροχώρο. Τέλος, τα θυλακοειδή οργανώνονται σε μεμβρανικές στοιβάδες οι οποίες καλούνται grana (εικόνα 1.6). Οι φωτοσυνθετικές μονάδες βρίσκονται στις μεμβράνες των θυλακοειδών και αποτελούνται από πρωτεΐνες και φωτοσυνθετικές χρωστικές (χλωροφύλλες και καροτενοειδή), οργανωμένες σε σύμπλοκα πρωτεϊνών/χρωστικών και πραγματοποιούν τις φωτεινές αντιδράσεις. Οι σκοτεινές αντιδράσεις πραγματοποιούνται από ένζυμα τα οποία κινούνται ελεύθερα στο θεμαλιώδες υλικό του στρώματος.



1.2.2 Η Δομή και Λειτουργεία του Φωτοσυνθετικού Μηχανισμού

**Εικόνα 1.6 :** Η δομή του χλωροπλάστη. Διακρίνονται οι μεμβράνες του πλαστιδιακού φακέλου, το στρώμα και τα θυλακοειδή (Kirchhoff 2018).

Η φωτοσυνθετική μονάδα αποτελείται από τρία κύρια σύμπλοκα: το φωτοσύστημα II (PSII), το Φωτοσύστημα I (PSI) και το κυτόχρωμα  $b_6/f$  (cyt  $b_6/f$ ), ενώ συμμετέχει και μία ATP-συνθάση. Το PSII αποτελείται από το σύμπλοκο συλλογής φωτός (Light Harvesting Complex, LHCII) και από τον πυρήνα του φωτοσύστηματος II. Το σύμπλοκο συλλογής φωτός (LHCII) αποτελείται από σειρά πρωτεϊνών και μορίων χλωροφύλλης a, χλωροφύλλη b και καροτενοειδή και βρίσκεται ενσωματωμένο στην μεμβράνη των θυλακοειδών. Στο PSII υπάρχει ένα διμερές χλωροφύλλης a στο κέντρο αντίδρασης, που απορροφά εντονότερα στα 680 nm και συμβολίζεται  $P_{680}$ .

Το PSI αποτελείται από το δικό του σύμπλοκο συλλογής φωτός (LHCI) και τον πυρήνα του PSI. Στο PSI υπάρχει ένα διμερές χλωροφύλλης a στο κέντρο αντίδρασης που απορροφά εντονότερα στα 700nm (P<sub>700</sub>). Το σύμπλοκο LHCI δρα ως βοηθητική κεραία, η οποία συγκεντρώνει το φως και μεταφέρει την ενέργειά του στο P<sub>700</sub>, που είναι ο πρωτογενής ηλεκτρονιοδότης του κέντρου αντίδρασης. Εκτός από P<sub>700</sub>, το πρωτεϊνικό σύμπλοκο περιέχει επίσης χρωστικές και οξειδοαναγωγικούς παράγοντες, που είναι απαραίτητοι για να επιτευχθεί η μεταφορά των ηλεκτρονίων στο PSI. Με την λειτουργία των φωτοσυστημάτων PSI και PSII αξιοποιείται όλο το φάσμα της φωτοσυνθετικά ενεργής ακτινοβολίας (PAR). Το cytb<sub>6</sub>/f αποτελεί ενδιάμεσο πρωτεϊνικό σύμπλοκο μεταξύ του PSII και του PSI στη μη κυκλική μεταφορά ηλεκτρονίων, που αποτελείται από τέσσερις κύριες πρωτεΐνες, το κυτόχρωμα b6, το κυτόχρωμα f, την υπομονάδα IV και μια πρωτεΐνη Fe-S. Τα ηλεκτρόνια που προκύπτουν από την απορρόφηση ενέργειας στο PSII μέσω της πλαστοκινόνης αποδίδονται στο πρωτεϊνικό σύμπλοκο του cyt b<sub>6</sub>/f, έπειτα στην πλαστοκυανίνη και από εκεί στο PSI (εικόνα 1.7).



Εικόνα 1.7 : Δομική περιγραφή του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, με τα τρία κύρια σύμπλοκα χρωστικών/πρωτεϊνών και την ΑΤΡ-συνθάση. Με τα βέλη φαίνονται τα μονοπάτια μεταφοράς ηλεκτρονίων και πρωτονίων (Anna et al. 2013).

Κατά τη διάρκεια της φωτοσυνθετικής μεταφοράς των ηλεκτρονίων μεταφέρονται πρωτόνια (H<sup>+</sup>) από το στρώμα στο μικροχώρο και ως εκ τούτου δημιουργείται μια διαβάθμιση πρωτονίων μεταξύ των δύο πλευρών της μεμβράνης των θυλακοειδών (στρώματος και μικροχώρου). Η σύνθεση του ATP από ADP, Pi και πρωτόνια καταλύεται από ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο, που είναι γνωστό ως ATP-συνθάση ή ATPάση. Όταν η παραγωγή ATP γίνεται από τη διαβάθμιση πρωτονίων που προκύπτει από τη μη-κυκλική ροή ηλεκτρονίων τότε μιλάμε για μη-κυκλική φωτοφωσφορυλίωση, ενώ αντίστοιχα όταν προκύπτει από την κυκλική ροή ηλεκτρονίων τότε μιλάμε για κυκλική φωτοφωσφορυλίωση.

#### 1.2.3. Μη κυκλική ροή ηλεκτρονίων

Στην μη κυκλική φωτοφοσφορυλίωση συμμετέχει το φωτοσύστημα Ι και το φωτοσύστημα ΙΙ (Walker 2002; Zerges 2002; Allen 2003). Ένα φωτόνιο μετά από αλυσιδωτή διέγερση και αποδιέγερση μορίων του συμπλόκου συλλογής φωτός προκαλεί διέγερση του φωτοσυστήματος P<sub>680</sub>(P<sub>680</sub>\*). Αυτό με τη σειρά του μεταφέρει ένα ηλεκτρόνιο στη φαιοφυτίνη (Pheo a) το οποίο μεταφέρεται από τη διεγερμένη P680\* στον πρωτογενή ηλεκτρονιοδέκτη και παίρνει ηλεκτρόνιο από τη διάσπαση ενός μορίου νερού σχηματίζοντας οξυγόνο και ιόντα υδρογόνου. Η ανηγμένη φαιοφυτίνη δίνει ένα ηλεκτρόνιο στην κινόνη QA και αυτή στην κινόνη QB, η οποία μετατρέπεται σε ημικινόνη QB, ενώ τα κατιόντα υδρογόνου θα κατευθυνθούν στο μικρογώρο (εικόνα 1.8). Μετά από την απορρόφηση ενός δεύτερου φωτονίου και αφού πάρει δύο πρωτόνια από το στρώμα, η κινόνη QB ανάγεται σε πλαστοκινόνη PQH2. Το ηλεκτρόνιο τελικά φτάνει στο PSI όπου προηγήθηκε διέγερση του κέντρου αντίδρασης Ρ700 και το ηλεκτρόνιο μεταφέρεται στην φερρεδοξίνη και στη συνέχεια στο ένζυμο αναγωγάση του NADP<sup>+</sup> που προκαλεί αναγωγή του NADP<sup>+</sup> σε NADPH. Η διαφορά πρωτονιακής συγκέντρωσης που δημιουργείται μεταξύ στρώματος και μικροχώρου, από τη λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, είναι η κινητήρια δύναμη pmf (proton motive force) που θα ενεργοποιήσει την ΑΤΡαση και θα δημιουργήσει ΑΤΡ.



Εικόνα 1.8: Μή κυκλική και κυκλική φωτοσυνθετική ροή ηλεκτρονίων. Αριστερά φαίνεται το οξειδοαναγωγικό δυναμικό των επιμέρους ηλεκτρονιομεταφορέων. Μεταξύ των ηλεκτρονιομεταφορέων που συμμετέχουν συμπεριλαμβάνονται η τυροζίνη Z (Zκινόνες (QA & QB), η δεξαμενή της πλαστοκινόνης (PQ), κυτοχρώματα b6(Cytb6) και f (Cytf), κέντρα Fe-S της πρωτείνης Rieske (FeSR), η πλαστοκυανίνη (PC) και η φερρεδοξίνη (Fd). P680: Κέντρο αντίδρασης του φωτοσυστήματος II, P700: Κέντρο αντίδρασης του φωτοσυστήματος I (Govindjee et al. 2016).

#### 1.2.4. Κυκλική ροή ηλεκτρονίων

Όταν οι απαιτήσεις του φωτοσυνθετικού μηχανισμού είναι μεγαλύτερες σε ATP απ'ότι σε NADPH, παράλληλα με την μη κυκλική ροή ηλεκτρονίων ενεργοποιείται και η κυκλική ροή. Στην κυκλική φωτοφοσφορυλίωση συμμετέχει μόνο το φωτοσύστημα I (PSI) (Walker 2002; Zerges 2002; Allen 2003). Σε αυτή την περίπτωση, αντί να μετατοπιστούν τα ηλεκτρόνια από τη φερρεδοξίνη στην αναγωγάση του NADP<sup>+</sup>, επανέρχονται στο σύμπλοκο των κυτοχρωμάτων και από εκεί στο κέντρο αντίδρασης στο PS I. Λόγω της διαφοράς δυναμικού που δημιουργείται μεταξύ του μικροχώρου και του στρώματος (λόγω της εισόδου H<sup>+</sup> από το στρώμα στον μικροχώρο, στο επίπεδο της δεξαμενής της πλαστοκινόνης), σχηματίζεται ATP (κυκλική φωτοφωσφορυλίωση). Η διαδικασία αυτή δεν συνοδεύεται από τη δημιουργία του οξειδωαναγωγικού παράγοντα NADPH (εικόνα 1.9).



Εικόνα 1.9: Η μη κυκλική και κυκλική ροή ηλεκτρονίων. Δεξιά: η κυκλική ροή ηλεκτρονίων στην οποία τα ηλεκτρόνια, αντί για τη μεταφορά από τη φερρεδοξίνη στο NADP<sup>+</sup>, καταλήγουν μέσω της δεξαμενής της πλαστοκινόνης και πάλι στο PSI δημιουργώντας διαφορά δυναμικού μεταξύ στρώματος και μικροχώρου που εκτονώνεται με τον σχηματισμό ATP (Allen ,2003).

#### 1.4 Δυνατότητα παραγωγής υδρογόνου από χλωροφύκη

Το αέριο υδρογόνο (H<sub>2</sub>) θεωρείται ένα πολλά υποσχόμενο καύσιμο για το μέλλον που θα συνεισφέρει στο να μειωθεί η ατμοσφαιρική ρύπανση, η υπερθέρμανση του πλανήτη αλλά και στο να προστατευθεί το περιβάλλον με βιώσιμο τρόπο. επίσης, το υδρογόνο έχει μεγάλη απόδοση και ταυτόχρονα κατά την καύση του δίνει νερό, περιορίζοντας τα τοξικά παραπροϊόντα (Antal et al. 2011). Έγει αποδειγθεί ότι κάποιοι οργανισμοί είναι ικανοί να παράγουν υδρογόνο υπό ανοξικές συνθήκες μέσω της ενεργοποίησης τριών διαφορετικών οδών, χρησιμοποιώντας υδρογονάσες ως καταλύτες (Dubini and Ghirardi 2014). Αυτοί οι οργανισμοί είναι τα χλωροφύκη και τα κυανοβακτήρια (Ghirardi et al., 1997). Ιστορικά, ο Hans Gaffron, πριν από 80 χρόνια, έκανε την πρώτη παρατήρηση παραγωγής υδρογόνου από τα χλωροφύκη και συγκεκριμένα από το μονοκύτταρο γλωροφύκος Scenedesmus obliquus (Gaffron, 1939; 1944; Gaffron and Rubin 1942). Επειδή τα χλωροφύκη μπορούν να συνδέσουν άμεσα την φωτοσυνθετική οξείδωση του νερού και την παραγωγή υδρογόνου από υδρογονάσες, υπάργει μεγάλη ελπίδα για παραγωγή άφθονης ενέργειας από τις θεμελιωδώς απεριόριστες πηγές νερού και ηλιακού φωτός (Dubini and Ghirardi 2014). Η ενέργεια που παρέχεται από το φως διευκολύνει την οξείδωση των μορίων του νερού, την απελευθέρωση ηλεκτρονίων και πρωτονίων και την μεταφορά αυτών των ηλεκτρονίων στη φερρεδοξίνη (Florin et al. 2001). Η φερρεδοξίνη υπό ανοξικές συνθήκες χρησιμεύει ως φυσιολογικός δότης ηλεκτρονίων στην υδρογενάση, και έτσι συνδέει την υδρογενάση με την φωτοσυνθετική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (Melis et al. 2001; Melis 2007). Οι υψηλότεροι ρυθμοί παραγωγής υδρογόνου παρατηρούνται συνήθως στο φως σε αναερόβιες συνθήκες επειδή το O2 είναι ισχυρός αναστολέας των ενζύμων αυτών (Ghirardi et al. 2000). Υπάρχουν τρία κύρια βιοσυνθετικά μονοπάτια που οδηγούν στην παραγωγή υδρογόνου που χρησιμοποιείται από τα γλωροφύκη υπό ανοξικές συνθήκες: το PSII εξαρτημένο και το PSII ανεξάρτητο μονοπάτι (Εικόνα 1.10), αλλά και το μονοπάτι της σκοτεινής ζύμωσης (dark fermentation).



#### Εικόνα

**1.10**: Διαδρομές μεταφοράς ηλεκτρονίων που σχετίζονται με υδρογονάση (H<sub>2</sub>ase), σε χλωροφύκη. Τα ηλεκτρόνια μπορεί να προέρχονται είτε από το PSII κατά τη φωτοοξείδωση του νερού, είτε από την δεξαμενή πλαστοκινόνης (PQ) κατά την οξείδωση του κυτταρικού ενδογενούς υποστρώματος (π.χ. μέσω γλυκόλυσης και του κύκλου τρικαρβοξυλικού οξέος). Τα ηλεκτρόνια στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων μεταφέρονται μέσω PSI στη φερρεδοξίνη (Fd), η οποία χρησιμεύει, σε ανοξικές συνθήκες, ως φυσιολογικός δότης ηλεκτρονίων της υδρογονάσης. P<sub>680</sub>, κέντρο αντίδρασης PSII; P<sub>700</sub>, κέντρο αντίδρασης PSI; Q, πρωταρχικός δέκτης ηλεκτρονίων του PS II; A, πρωταρχικός δέκτης ηλεκτρονίων PSI. Cyt, κυτόχρωμα; PC, πλαστοκυανίνη; H<sub>2</sub>ase, υδρογονάση; FNR, ferredoxin-NADP<sup>+</sup> αναγωγάση (Melis et al. 2001).

Στη διαδρομή παραγωγής υδρογόνου από το PSII εξαρτώμενο μονοπάτι, ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός απορροφά το φως και η ανακτημένη ενέργεια χρησιμοποιείται για να διευκολύνει τη διάσπαση του νερού, με αποτέλεσμα τη μεταφορά ηλεκτρονίων στην φωτοσυνθετική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων για την παραγωγή χαμηλού αναγωγικού δυναμικού, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αναγωγή πρωτονίων σε μοριακό υδρογόνο μέσω του ένζυμου της υδρογενάσης. Το κύριο μειονέκτημα αυτής της διαδικασίας είναι η ακραία ευαισθησία της υδρογενάσης στο O<sub>2</sub> που παράγεται και απελευθερώνεται με την φωτοσυνθετική διάσπαση του νερού (Hallenbeck and Benemann 2002). Από την άλλη πλευρά, στο PSII ανεξάρτητο μονοπάτι, τα ηλεκτρόνια απελευθερώνονται μέσω του καταβολισμού του αμύλου και διοχετεύονται μέσω της δεξαμενής της πλαστοκινόνης (PQ) στο φωτοσύστημα I παρακάμπτοντας το φωτοσύστημα II (Melis et al., 2000). Με αυτόν τον τρόπο το πρόβλημα της ευαισθησίας της εξελισσόμενης διαδικασίας υδρογόνου παρακάμπτεται δυνητικά από την απελευθέρωσης οξυγόνου (Hallenbeck and Benemann, 2002). Τέλος, στο μονοπάτι της φωτοανεξάρτητης ζύμωσης (dark fermentation) (Hallenbeck and Benemann 2002), η πλειοψηφία της παραγωγής μορίων υδρογόνου καθοδηγείται από τον αναερόβιο μεταβολισμό του πυροσταφυλικού οξέος, που σχηματίζεται κατά τη διάρκεια του καταβολισμού διαφόρων οργανικών υποστρωμάτων. Στα πλαίσια αυτής της διαδικασίας, το ένζυμο πυροσταφυλική αναγωγάση της φερρεδοξίνης (PFOR) τροφοδοτεί τη φερρεδοξίνη με ηλεκτρόνια και με τη σειρά της τα προωθεί στην υδρογενάση για την παραγωγή H<sub>2</sub>. Αυτό είναι το κυρίαρχο μονοπάτι παραγωγής H<sub>2</sub> στους λειχήνες, τόσο στο σκοτάδι όσο και στο φως (Papazi et al. 2015).

Η πιο πλεονεκτική πτυχή ενός συστήματος παραγωγής φωτοσυνθετικού υδρογόνου είναι η χρήση του νερού ως πηγή αναγωγικού μέσου (Ghirardi et al. 1997). Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η παραγωγή υδρογόνου καταλύεται από την υδρογενάση η οποία ενεργοποιείται σε κύτταρα χλωροφυκών κατά την έκθεση σε αναερόβιες συνθήκες για σύντομο χρονικό διάστημα. Ωστόσο, μόλις εμφανιστεί φωτισμός απενεργοποιείται η υδρογενάση λόγω της παρουσίας φωτοσυνθετικά παραγόμενου οξυγόνου (Melis et al. 2000). Το υδρογόνο μπορεί να δημιουργηθεί από τα χλωροφύκη ως μηχανισμός παραγωγής ΑΤΡ που απαιτείται για την επιβίωση υπό αναερόβιες συνθήκες. Αυτό συμβαίνει λόγω της ανεπάρκειας οξυγόνου και της απενεργοποίησης του PSII, που περιορίζουν την μιτοχονδριακή αναπνοή και την οξυγονική φωτοσύνθεση και κατ' επέκταση την παραγωγή του ΑΤΡ (Melis et al. 2000).

Η δυνατότητα των μικροφυκών να ενεργοποιούν τέτοιους μηχανισμούς σε συνθήκες ανοξίας για να παράγουν υδρογόνο, είτε είναι PSII εξαρτώμενη είτε όχι, πιθανότατα συνεισφέρει στη διατήρησης μιας μερικώς οξειδωμένης κατάστασης της φωτοσυνθετικής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων και επομένως στην παραγωγή της ελάχιστης ενέργειας που χρειάζεται, ώστε να αποφευχθεί η κατάρρευση της χλωροπλαστικής και μιτοχονδριακής δραστηριότητας (Melis and Happe 2001).

20

### 1.5 Φωτοσυνθετική παραγωγή υδρογόνου από λειχήνες

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ο λειχήνας είναι ένα συμβιωτικό σύστημα οργανισμών, που αποτελείται κυρίως από έναν μύκητα και ένα χλωροφύκος ή κυανοβακτήριο. Επίσης έγινε ήδη αναφορά στην ικανότητά των χλωροφυκών να παράγουν υδρογόνο με περιοριστικό παράγοντα την ύπαρξη O<sub>2</sub> που δρα ως αναστολέας της υδρογενάσης. Σε έρευνα των Papazi et al. (2015) διαπιστώθηκε πως ο λειχήνας μπορεί να παράγει υδρογόνο σε κλειστό σύστημα καθώς ο μυκοβιώτης καταναλώνει το οξυγόνο μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας και ο φωτοβιώτης παράγει υδρογόνο κυρίως μέσω του μονοπατιού της dark fermentation. Αυτά τα πλεονεκτήματα της συμβίωσης οργανισμών στα πλαίσια ενός λειχήνα, σε συνδυασμό με την ικανότητά τους να επιβιώνουν σε ακραία περιβάλλοντα (ενώ βρίσκονται σε αφυδατωμένη κατάσταση) τους καθιστούν μοναδικά και πολύτιμα φυσικά εργοστάσια παραγωγής υδρογόνου και ανοίγουν το δρόμο για μελλοντικές βιοτεχνολογικές εφαρμογές ακόμη και σε ακραία περιβάλλοντα (εικόνα 1.11) (Papazi et al. 2015; Parasyri et al. 2018). A. Lichens after regeneration stage



B. Lichens under anoxic conditions in light



C. Lichens under anoxic conditions in dark



Εικόνα 1.11: Προτεινόμενα μεταβολικά μοντέλα λειχήνων σε διαφορετικές συνθήκες σύμφωνα με τους Papazi et al. (2015). Α. Λειχήνες αμέσως μετά την αναγέννηση: Η φωτόλυση του νερού στο PSII του φωτοβιώτη (PSII εξαρτώμενη μεταφορά ηλεκτρονίων) και η αναγωγή της γλυκόζης τροφοδοτούν με ηλεκτρόνια τη δεξαμενή της πλαστοκινόνης και από εκεί καταλήγουν στη φερρεδοξίνη μέσω του PSI ή της PFOR για την παραγωγή NADPH και

τη σύνθεση λιπιδίων. Σε αυτές τις συνθήκες η συγκέντρωση του οξυγόνου παραμένει υψηλή, απενεργοποιώντας την υδρογενάση. **Β.** Λειχήνες σε ανοξικές συνθήκες στο φως: Όταν οι λειχήνες βρεθούν σε κλειστό σύστημα, το οξυγόνο καταναλώνεται από την αναπνευστική αλυσίδα κυρίως του μυκοβιώτη, αλλά και του φωτοβιώτη, δημιουργώντας τελικά ανοξικές συνθήκες και παράλληλα το PSII απενεργοποιείται. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, τα ηλεκτρόνια να μεταφέρονται μέσω PQ από το PSI στη φερρεδοξίνη και τελικά στην υδρογενάση. Επιπλέον, ηλεκτρόνια μεταφέρονται στη φερρεδοξίνη και μέσω της PFOR κατά το μεταβολισμό των σακχάρων. **C.** Λειχήνες σε ανοξικές συνθήκες στο σκοτάδι: Σε συνθήκες έλλειψης φωτός, το PSII εξαρτώμενο και PSII ανεξάρτητο μονοπάτι απενεργοποιούνται, ενώ παραμένει ενεργοποιημένο το μονοπάτι της dark fermentation. Στο σκοτάδι κατά κύριο λόγο η PFOR τροφοδοτεί τη φερρεδοξίνη με ηλεκτρόνια και με τη σειρά της τα προωθεί στην υδρογενάσηγια την παραγωγή H<sub>2</sub>. Αυτό είναι το κυρίαρχο μονοπάτι παραγωγής H<sub>2</sub> στους λειχήνες, τόσο στο σκοτάδι όσο και στο φως (Papazi et al. 2015).

## 1.6 Η ακραιόφιλη συμπεριφορά των λειχήνων και αστροβιολογικές προεκτάσεις

Μέχρι τώρα είδαμε πως ο λειχήνας είναι ένα ιδιαίτερο μικρό-οικοσύστημα που αποτελείται κατά κύριο λόγο από έναν μύκητα και ένα χλωροφύκος ή κυανοβακτήριο. Αυτή η συμβίωση προσφέρει πλεονεκτήματα και στους δύο οργανισμούς που συμμετέχουν, όπως για παράδειγμα την ικανότητα επιβίωσης κάτω από αντίξοες συνθήκες καθώς και την ροή υλικών και ενέργειας μέσω ξεχωριστών συστημάτων.

Μελέτες έχουν αποδείξει την ικανότητα επιβίωσης των αφυδατωμένων λειχήνων σε προσομοιωμένες ή πραγματικές ακραίες συνθήκες, που περιλαμβάνουν κενό (10<sup>-7</sup> έως 10<sup>-4</sup> Pa) (Horneck et al. 2010), κοσμική ιονίζουσα ακτινοβολία (έως 190 mGy) (Berger et al. 2012), διακυμάνσεις της θερμοκρασίας (-21,5°C έως + 59.6°C) (Rabbow et al. 2012) και ηλιακή εξωγήινη ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία (έως 6,34 · 10<sup>8</sup> J m<sup>-2</sup>) (Onofri et al. 2012). Αποδείχθηκε πως η βιωσιμότητα και η βλαστική ικανότητα των λειχήνων δεν επηρεάστηκαν σημαντικά όταν εκτεθήκαν σε κενό και υπεριώδη ακτινοβολία (de Vera et al. 2003; 2004). Η ίδια παρατήρηση έγινε και μετά την έκθεση των λειχήνων σε προσομοιωμένες συνθήκες που μοιάζουν με τον Άρη για 22 ημέρες (de Vera et al. 2010) και σε πραγματικές συνθήκες διαστήματος για 16 ημέρες (Sancho et al. 2007) ή 10 ημέρες (Raggio et al. 2011), αντίστοιχα. Οι δοκιμές ζωτικότητας και καλλιέργειας έδειξαν ότι ο ανακτήθηκε πλήρως η δυνατότητα των λειχήνων να βλαστήσουν και να μεγαλώσουν μετά την επιστροφή τους στη Γη. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί η ικανότητα των λειχήνων να παράγουν υψηλή ποσότητα μοριακού υδρογόνου (H<sub>2</sub>) και μετά την έκθεση τους σε ακραίες θερμοκρασίες (-196°C) (Papazi et al. 2015). Σε ένα κλειστό σύστημα, ο μυκοβιώτης του συστήματος καταναλώνει το οξυγόνο και ο φωτοβιώτης παράγει υδρογόνο μέσω της φωτοσύνθεσης. Η κατανάλωση οξυγόνου επιτρέπει την ενεργοποίηση της ευαίσθητης στο οξυγόνο υδρογενάσης, προκειμένου να παράγουν H<sub>2</sub> κυρίως μέσω του μονοπατιού της dark fermentation (Papazi et al., 2015). Το μοριακό υδρογόνο θεωρείται ένα από τα πιο αποδεκτά καύσιμα του μέλλοντος (Antal et al., 2011) και αυτή η δυνατότητα των λειχήνων δίνει προοπτικές για βιοτεχνολογικές εφαρμογές σε ακραία περιβάλλοντα άλλων πλανητών (Parasyri et al. 2018).

Μέχρι τώρα είδαμε πως ο λειχήνας είναι ένα ιδιαίτερο μικρο-οικοσύστημα που έχει την ικανότητα να επιβιώνει κάτω από αντίξοες συνθήκες. Στα πλαίσια ελέγχου της avθεκτικότητας, δύο είδη λειχήνων, τα *Rhizocarpon geographicum* και *Xanthoria elegans* χρησιμοποιήθηκαν για το πείραμα LICHEN (Sancho et al. 2007), κατά το οποίο εκτέθηκαν σε συνθήκες αντίστοιχες του πλανήτη Άρη. Οι λειχήνες παρέμειναν στο διάστημα για δύο εβδομάδες και στη συνέχεια ελέγχθηκε η βιωσιμότητά τους μέσω μετρήσεων επαγωγικού φθορισμού, οι οποίες έδειξαν ότι ανακτήθηκε πλήρως η φωτοσυνθετική τους δραστηριότητα μετά από 24 ώρες. Επιπλέον, με τη χρήση μικροσκοπίας και με την τεχνική χρώσης LIVE/DEAD (BacLight kit) φάνηκε ότι οι μεμβράνες των δύο συμβιωτών έμειναν ανέπαφες για το μεγαλύτερο ποσοστό των κυττάρων (Sancho et al. 2007).



Εικόνα 1.12 Λειχήνας Pleopsidium chlorophanum σε αναλογικό υπόστρωμα S-MRS Mars. (Hsu 2014)

Το υψηλό δυναμικό επιβίωσης του λειχήνα, που αποδεικνύεται από πραγματικά πειράματα σε και προσομοιωμένα ακραία περιβάλλοντα του πλανήτη Άρη (εικόνα 1.12) (Onofri et al. 2008; 2011), αντικρούουν την άποψη ότι οι προκαρυωτικοί μικροοργανισμοί είναι οι μόνες μορφές ζωής που θα μπορούσαν να επιβιώσουν στην επιφάνεια άλλων πλανητών στο ηλιακό μας σύστημα (Horneck 2000; Westall et al. 2000).

Η ακραιόφιλη συμπεριφορά των λειχήνων επαναφέρει τη θεωρία πιθανής διαπλανητικής μεταφοράς βιολογικού υλικού, όπως προτείνεται από τη θεωρία της πανσπερμίας. Η θεωρία της πανσπερμία υποστηρίζει ότι τα αναπαραγωγικά σώματα των οργανισμών μπορούν να υπάρχουν σε όλο το σύμπαν και να αναπτυχθούν όπου είναι ευνοϊκό το περιβάλλον (Richter 1865; Arrhenius 1903). Σε αυτή την θεωρία περιλαμβάνεται και η θεωρία της λιθοπανσπερμίας που περιγράφει τη βιώσιμη μεταφορά μικροοργανισμών μέσω μετεωριτών (Arrhenius 1903; Melosh 1988) ). Με αυτό τον τρόπο μπορεί να γίνει μεταφορά ζωής από έναν κατοικήσιμο σε ένα μη κατοικήσιμο πλανήτη. Επίσης οι λειχήνες είναι ιδανικά μοντέλα για μελλοντικές αστροβιοτεχνολογικές εφαρμογές, όπως η παραγωγή ενέργειας (παραγωγή H<sub>2</sub>) και η ανάπτυξη συστημάτων βιοαναγέννησης σε εξωγήινα περιβάλλοντα (Parasyri et al. 2018).

#### 1.7 Ο σκοπός της παρούσας εργασίας

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της δυνατότητας επιβίωσης του λειχήνα *Pleurosticta acetabulum* σε ακραίες εντάσεις UVB ακτινοβολίας, αλλά και σε συνδυασμό με ακραίες θερμοκρασίες, διατηρώντας τη μεταβολική του δυνατότητα να παράγει υδρογόνο (H<sub>2</sub>). Για την επίτευξη αυτού του στόχου θα διεξαχθούν πειράματα που θα αφορούν την έκθεση του λειχήνα σε υψηλής έντασης UVB ακτινοβολία για διαφορετικά χρονικά διαστήματα. Η επιβίωση του θα ελεγχθεί με μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού (OJIP test), καταγράφοντας τις αλλαγές της μοριακής δομής και λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Αν μετά την έκθεση του λειχήνα σε ακραίες συνθήκες UVB ακτινοβολίας διαπιστωθεί η λειτουργικότητα του, θα πραγματοποιηθούν δοκιμές για παραγωγή υδρογόνου σε κλειστά συστήματα. Η μέτρηση του παραγόμενου υδρογόνου θα γίνει με την μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας θερμικής αγωγιμότητας (GC-TCD).

# 2.Υλικά και μέθοδοι

# 2.1. Οργανισμοί

# 2.1.1 Ο Λειχήνας Pleurosticta acetabulum

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με τον λειχήνα Pleurosticta acetabulum του οποίου η φυλογενετική ταξινόμηση φαίνεται στο διπλανό πίνακα. Το συγκεκριμένο είδος βρίσκεται σε σχετική αφθονία στη φύση και η συλλογή του έγινε από κορμούς δέντρων του είδους Acer sempervirens και Quercus coccifera στο όρος Ίδη

Βασίλειο: ΜύκητεςΔιαίρεση: AscomycotaΚλάση: LecanoromycetesΤάξη: LecanoralesΟικογένεια: PleurostictaceaeΓένος: Pleurosticta

(HTRS07/TM07X=578576.83m, Y=1900901.19m). Ο λειχήνας αυτού του είδους αποτελεί συμβίωση μεταξύ ενός μύκητα Ascomycota και ενός χλωροφύκους του γένους *Trebouxia*. Μορφολογικά μοιάζει με φύλλο, το οποίο στην μεταβολικά ανενεργή κατάσταση έχει σκούρο πράσινο προς καφέ χρώμα, ενώ όταν αναγεννηθεί το χρώμα γίνεται έντονο ανοιχτό πράσινο (Εικόνα 2.1).



**Εικόνα 2.1:** Αριστερά Ο λειχήνας *Pleurosticta acetabulum* σε μεταβολικά ενεργή κατάσταση. Δεξιά: Ο λειχήνας *Pleurosticta acetabulum* σε αδρανή κατάσταση.

Το πρωτόκολλο για την αναγέννηση του λειχήνα περιλαμβάνει την βύθιση του αφυδατωμένου λειχήνα σε νερό με θερμοκρασία 25°C για 48 ώρες.

# 2.2 Τα μονοκύτταρα χλωροφύκη Scenedesmus obliquus και Chlorella vulgaris

Το χλωροφύκος Scenedesmus obliquus είναι ένα μονοκύτταρο ευκαρυωτικό χλωροφύκος, τα κύτταρα του οποίου έχουν ωοειδές σχήμα και μήκος 5-10μm (Εικόνα 2.2.). Η καλλιέργειά του έγινε αυτότροφα σε θρεπτικό μέσο των Bishop and Senger (1971). Η σύσταση του θρεπτικού μέσου φαίνεται στον Πίνακα 2.1. Η καλλιέργεια αναπτύσσεται σε ειδική κατασκευή, η οποία εξασφαλίζει τη συνεχή παροχή αέρα στις καλλιέργειες και σε θερμοκρασία 30°C, με συνεχή φωτισμό 150μmol.m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>.

Βασίλειο: ΦυτάΔιαίρεση: ΧρωρόφυταΚλάση: ΧλωροφύκηΤάξη: ChlorococcalesΟικογένεια:ScenedesmaceaeΓένος: ScenedesmusΕίδος: Scenedesmusobliquus



Eικόνα 2.2: Κύτταρα Scenedesmus obliquus. (<u>https://ccala.but</u> <u>bn.cas.cz/en/scen</u> <u>edesmus-</u> <u>obliquus-turpin-</u> <u>kuetzing-1</u>)

Η Chlorella vulgaris είναι ένα ευκαρυωτικό χλωροφύκος που ανήκει στο γένος Chlorella και η ταξινήμηση του φαίνεται παρακάτω. Αυτό το μονοκύτταρο φύκος ανακαλύφθηκε το 1890 από τον Martinus Willem Beijerinck ως το πρώτο μικροφύκος με έναν καλά καθορισμένο πυρήνα που έχει ένα παχύ κυτταρικό τοίχωμα (100-200 nm) ως το κύριο χαρακτηριστικό του (εικόνα 2.3). Αυτό το κυτταρικό τοίχωμα παρέχει μηχανική και χημική προστασία και έτσι έχει αντοχή στα βαρέα μέταλλα. Η σύσταση του θρεπτικού μέσου φαίνεται στον Πίνακα 2.1. Η καλλιέργεια αναπτύσσεται σε ειδική κατασκευή, η οποία εξασφαλίζει τη συνεχή παροχή αέρα στις καλλιέργειες και σε θερμοκρασία 25°C, με 16 ώρες φωτοπερίοδο 40μmol.m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>.

Βασίλειο: Φυτά Διαίρεση: Χρωρόφυτα Κλάση: Χλωροφύκη Τάξη: Chlorococcales Οικογένεια: Chlorellaceae Γένος: Chlorella Είδος: Chlorella vulgaris



Eικόνα 2.3: Κότταρα Chlorella vulgaris (https://algaere searchsupply.co m/products/alg ae-culturechlorellavulgaris)

**Πίνακας 2.1:** Αριστερά το θρεπτικό Bishop-Senger Medium για την καλλιέργεια του *Scenedesmus obliquus* και δεξιά το θρεπτικό Bold's Basal medium για την καλλιέργεια της *Chlorella vulgaris*.

Bishop-Senger Medium	Συγκέντρωση	Bold's Basal medium	Συγκέντρωση
		NanO <sub>3</sub>	250mg/L
KNO₃	8x10 <sup>-3</sup> M	NaCl	25mg/L
NaCl	8x10 <sup>-3</sup> M	$MgSO_4(H_2O)$	75mg/L
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	10 <sup>-3</sup> M	$K_2HPO_4(H_2O)$	75mg/L
NaH₂PO₄. 2H₂O	3x10 <sup>-3</sup> M	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (H <sub>2</sub> O)	175mg/L
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	10 <sup>-4</sup> M	CaCl2(H <sub>2</sub> O)	25mg/L
MgSO₄.7H₂O	10 <sup>-3</sup> M	EDTA	50mg/L
Fe(III)-citrate	10 <sup>-3</sup> M	КОН	31mg/L
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> .7H <sub>2</sub> O	7,5x10 <sup>-6</sup> M	FeSO <sub>4</sub> (H <sub>2</sub> O)	4,98mg/L
H₃BO₃	4,5x10 <sup>-5</sup> M	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ©	1ml/L
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	8x10 <sup>-6</sup> M	$MnCl_2(H_2O)_4$	1,44mg/L
ZnSO₄.7H₂O	7x10 <sup>-7</sup> M	ZnSO <sub>4</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>7</sub>	8,82mg/L
MoO₃	10 <sup>-7</sup> M	$Cu(II)SO_4(H_2O)_5$	1,57mg/L
CuSO₄.5H₂O	3x10 <sup>-7</sup> M	MoO <sub>3</sub>	0,71mg/L
		$Co(NO_3)_2(H_2O)_6$	0,49mg/L

## 2.2 Πειραματικοί χειρισμοί

Ο χειρισμός ελέγχου (μάρτυρας) για όλα τα πειράματα ήταν δείγμα λειχήνα σε αφυδατωμένη κατάσταση που αναγεννήθηκε με νερό χωρίς την έκθεση του σε UVB

ακτινοβολία (Control). Οι χειρισμοί που μελετήθηκαν περιλαμβάνουν την έκθεση αφυδατωμένου, αλλά και αναγεννημένου λειχήνα σε πολύ υψηλή UVB ακτινοβολία (1,7 mW/cm<sup>2</sup> = 1000 J/m<sup>2</sup>.min) για διάφορα χρονικά διαστήματα. Ο αφυδατωμένος λειχήνας εκτέθηκε για 4ώρες (240 KJ/m<sup>2</sup>), 20ώρες (1200 KJ/m<sup>2</sup>) και 70 ώρες (4200 KJ/m<sup>2</sup>) σε UVB ακτινοβολία (1,7 mW/cm<sup>2</sup>) (χειρισμοί: UVB4h, UVB20h, UVB70h), ενώ ο αναγεννημένος λειχήνας εκτέθηκε για 70 ώρες σε ίδιας έντασης UVB ακτινοβολία (RUVB70h), που στη συνέχεια έγινε προσπάθεια αναγέννησης και στις δύο περιπτώσεις (εικόνα 2.4).



**Εικόνα 2.4:** Στα αριστερά ο λειχήνας δέχεται την επίδραση ισχυρής UVB ακτινοβολίας και στην συνέχεια (στα δεξιά) αναγεννάται για 48 ώρες σε νερό.

επίσης, μελετήθηκε η συνδυαστική έκθεση του λειχήνα σε υψηλής έντασης UVB ακτινοβολία (1,7 mW/cm<sup>2</sup>) για 70 ώρες (4200 KJ/m<sup>2</sup>), με την έκθεση του εν λόγω λειχήνα για 24 ώρες σε κενό και έκθεση του για μία ώρα σε ακραίες θερμοκρασίες (-196°C και +70°C). Πρόκειται για τους χειρισμούς UVB70h/-196°C και UVB70h/+70°C. Και στις δύο περιπτώσεις ακολούθησε, όπως και στους υπόλοιπους χειρισμούς, η αναγέννηση τους με την επώαση τους σε νερό για 48ώρες.

Αντίστοιχα με τα παραπάνω πειράματα, πραγματοποιήθηκε συγκριτική μελέτη με τα μονοκύτταρα χλωροφύκη Scenedesmus obliquus και Chlorella vulgaris για την αντοχή τους σε έκθεση ίδιας έντασης UVB ακτινοβολίας (1,7 mW/cm<sup>2</sup>) για 20 ώρες (1200 KJ/m<sup>2</sup>), σε κύτταρα καλλιέργειας που στέγνωσαν πάνω σε φίλτρο με συνεχή ροή αέρα σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 24 ώρες, αποσκοπώντας στην προσομοίωση των συνθηκών του μη αναγεννημένου λειχήνα. Και στις δύο περιπτώσεις, μετά την έκθεση σε UVB, τα φίλτρα τοποθετήθηκαν σε υγρό θρεπτικό για αναγέννηση.

#### 2.3 Μέτρηση Επαγωγικού Φθορισμού

Η μέτρηση του επαγωγικού φθορισμού έγινε με τη συσκευή Handy Plant Efficiency Analyser (Handy PEA, Hansatech Instruments, Εικόνα 2.5). Η συσκευή αυτή χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της μοριακής δομής και λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Κατά τη διάρκεια της φωτοσύνθεσης, μόνο ένα μέρος

της φωτονιακής ενέργειας απορροφάται από τις γρωστικές των φωτοσυστημάτων και χρησιμοποιείται διαδικασία στη της φωτοσύνθεσης, ενώ το υπόλοιπο εκπέμπεται με τη μορφή θερμότητας ή φθορισμού. Η διαδικασία της μέτρησης βασίζεται στο γεγονός ότι, όταν τα ενεργά κέντρα του φωτοσυνθετικού μηχανισμού έχουν «αδειάσει» από ηλεκτρόνια σε συνθήκες σκότους και βρεθούν σε κορεσμένο φωτισμό, τα επίπεδα φθορισμού μεταβαίνουν από ένα αργικό επίπεδο (Fo) σε ένα μέγιστο επίπεδο (Fm) και



**Εικόνα 2.5:** Η συσκευή Handy PEA και τα ειδικά clips για τη μέτρηση του επαγωγικού φθορισμού.

έπειτα μειώνονται σταδιακά. Έτσι, μπορεί να εκτιμηθεί ο λόγος Fv/Fm, όπου Fv=Fm-Fo, ο οποίος σχετίζεται με τη φωτοσυνθετική απόδοση. Επιπλέον, η μέθοδος αυτή (OJIP test, Strasser and Strasser 1995) δίνει τη δυνατότητα μέτρησης και άλλων παραμέτρων που συνδέονται με τη δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Οι παράμετροι αυτοί φαίνονται στον Πίνακα 2.2. Οι μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού σε δείγματα λειχήνα έγιναν προσαρμόζοντας ειδικά clips στην επιφάνεια του λειχήνα, τα οποία εξασφαλίζουν ότι αυτή η περιοχή θα βρίσκεται σε σκοτάδι για τουλάχιστον 5 λεπτά, προκειμένου να αδειάσουν τα ενεργά κέντρα αντίδρασης και στη συνέχεια να γίνει η μέτρηση του OJIP test (Strasser and Strasser 1995). Οι μετρήσεις της ταχείας μεταβολής του φθορισμού έγιναν με ανάλυση 10 μs σε χρονικό διάστημα 1 δευτερολέπτου. Ο φθορισμός μετρήθηκε με 12-bit ανάλυση και η διέγερση έγινε από 3 διόδους φωτισμού (LEDs) με ένταση ακτινοβολίας 3000μΕ ερυθρού φωτός. Η επεξεργασία των δεδομένων που προέκυψαν από τις μετρήσεις έγινε με το λογισμικό Biolyser HP 4.0, σύμφωνα με τους Strasser and Strasser (1995).

Μεταβλητή ΟJIP καμπύλης	Ορισμός
Ft	Τιμή φθορισμού σε χρόνο t μετά την
	ακτινοβόληση
F <sub>50µs</sub>	Ένταση φθορισμού στα 50 μs
F <sub>300µs</sub>	Ένταση φθορισμού στα 300 μs
F <sub>J</sub> =F <sub>2ms</sub>	Ένταση φθορισμού στο βήμα J (2 ms) της
	καμπύλης OJIP
F <sub>I</sub> =F <sub>30ms</sub>	Ένταση φθορισμού στο βήμα Ι (30 ms) της
	καμπύλης OJIP
F <sub>P</sub> (=F <sub>m</sub> )	Μέγιστη ένταση φθορισμού στο Ρ της
	καμπύλης OJIP
t <sub>Fm</sub>	Χρόνος σε (ms) που απαιτείται για να
	μεγιστοποιηθεί η ένταση του φθορισμού F <sub>m</sub>
Area	Συνολική συμπληρωματική περιοχή ανάμεσα
	στην καμπύλη ΟJIP και την ευθεία που
	διέρχεται από το F = F <sub>m</sub>
Παράμετροι JIP-test	
F <sub>o</sub>	Ελάχιστη τιμή φθορισμού, που αντιστοιχεί σε
	«ανοιχτά» κέντρα (open PSII RCs, t = 0)
F <sub>m</sub>	Μέγιστη τιμή φθορισμού, που αντιστοιχεί στο
	χρόνο όπου όλα τα κέντρα είναι «κλειστά»
	(closed PSII RCs, t = t <sub>Fm</sub> )
F <sub>v</sub>	Μεταβλητή τιμή φθορισμού τη χρονική
	στιγμή t
F <sub>v</sub> =F <sub>m</sub> -F <sub>0</sub>	Μέγιστη τιμή μεταβλητής τιμής φθορισμού
$V_t = (F_t - F_0)(F_m - F_0)$	Σχετική μεταβολή φθορισμού τη χρονική
	στιγμή t
V <sub>j</sub> =(F <sub>j</sub> -F <sub>0</sub> )(F <sub>m</sub> -F <sub>0</sub> )	Σχετική μεταβολή φθορισμού στο βήμα J
M <sub>0</sub> =(ΔV/Δt) <sub>0</sub> = 4(F300μ-F <sub>0</sub> )/(F <sub>m</sub> -F <sub>0</sub> )	Αρχική κλίση σε ms της καμπύλης V = f(t)
$S_m = (Area)/(F_m - F_0)$	Συμπληρωματικό εμβαδόν της καμπύλης ΟΙΙΡ
	(Area), ομαλοποιημένο ως προς F <sub>v</sub> (αποτελεί
	μέτρο του αριθμού των οξειδοαναγωγικών
	κύκλων της Q <sub>A</sub> )

#### Πίνακας 2.2: Βασικές παράμετροι του OJIP-test

Ss=Vj/Mo	Συμπληρωματικό εμβαδόν της καμπύλης OJIP			
	που αντιστοιχεί μόνο στην ΟJ φάση			
	(διάστημα όπου η Q <sub>A</sub> των RC ανάγεται μία			
	φορά)			
$N=S_m/S_s=S_mM_0(1/V_j)$	Μέτρο αριθμού κύκλων αναγωγής της Q <sub>A</sub> στο			
	διάστημα t <sub>Fm</sub>			
Ειδικές ροές ενέργειας (ανά κέντρο που ανάγει Q <sub>Α</sub> )				
$ABS/RC=M_0(1/V_j)(1/\Phi_{p0})$	Μέγεθος λειτουργικής φωτοσυλλεκτικής			
	κεραίας			
TR <sub>0</sub> /RC=M <sub>0</sub> (1/V <sub>J</sub> )	Ενέργεια που παγιδεύεται ανά κέντρο			
	αντίδρασης (t = 0)			
ET <sub>0</sub> /RC=M <sub>0</sub> (1/V <sub>J</sub> )WO	Ροή ηλεκτρονίων ανά κέντρο αντίδρασης (t			
	= 0)			
DI <sub>0</sub> /RC=(ABS/RC)-(TR <sub>0</sub> /RC)	Διαχεόμενη ενέργεια ανά κέντρο αντίδρασης			
	(t=0)			
Αποδόσεις ή λόγοι επιμέρους ροών				
$\Phi_{p0}=TR_0/ABS=[1-(F_0/F_m)]$	Μέγιστη κβαντική απόδοση της πρωτογενούς			
	φωτοχημείας (t = 0)			
$\Psi_0=ET_0/TR_0=1-V_J$	Πιθανότητα να προκαλέσει μια διέγερση τη			
	μετακίνηση ενός ηλεκτρονίου κατά μήκος της			
	αλυσίδας πέρα από την Q <sub>A</sub> - (t = 0)			
$Φ_{E0}=ET_0/ABS=[1-(F_0/F_m)]Ψ_0$	Κβαντική απόδοση της μεταφοράς			
	ηλεκτρονίων (t = 0)			
$\Phi D_0 = 1 - \Phi_{P0} = F_0 / F_m$	Κβαντική απόδοση της διάχυσης ηλεκτρονίων			
	(t = 0)			
Εκτιμώμενες ροές ενέργειας ανά διεγερμένη περιοχή				
ABS/CS <sub>0</sub>	Απορρόφηση ενέργειας ανά περιοχή			
	διέγερσης με βάση το Ϝ₀			
ABS/CS <sub>m</sub>	Απορρόφηση ενέργειας ανά περιοχή			
	διέγερσης με βάση το F <sub>m</sub>			
$TR_0/CS_0=FP_0(ABS/CS_0)$	Παγιδευμένη ενέργεια ανά διεγερόμενη			
	περιοχή της μεμβράνης (για t = 0)			
ET <sub>0</sub> /CS <sub>0</sub> =(ABS/CS <sub>0</sub> )	Ροή ηλεκτρονίων ανά περιοχή διέγερσης			
$DI_0/CS_0=(ABS/CS_0)-(TR_0/CS_0)$	Διαχεόμενη ενέργεια ανά περιοχή διέγερσης			

#### Πυκνότητα ενεργών κέντρων αντίδρασης

RC/CS₀	Πυκνότητα ενεργών κέντρων αντίδρασης
Δείκτες επίδοσης	
$PI_{ABS} = (RC/ABS)(\Phi_{P0}/1-\Phi_{P0})(\Psi_0/1-\Psi_0)$	Επιδόσεις ανά απορροφώμενη ενέργεια
$PI_{CS0}=(RC/CS_0)(\Phi_{P0}/1-\Phi_{P0})(\Psi_0/1-\Psi_0)$	Επιδόσεις ανά περιοχή διέγερσης (t = 0)
$PI_{CSm}=(RC/CS_m)(\Phi_{P0}/1-\Phi_{P0})(\Psi_0/1-\Psi_0)$	Επιδόσεις ανά περιοχή διέγερσης (t = t <sub>Fm</sub> )
$SFI_{ABS} = (1 - \Phi_{PO})(1 - \Psi_0)$	Δείκτης λειτουργικότητας

## 2.4 Ποσοτική εκτίμηση Η2 με τη χρήση GC-TCD

Η δυνατότητα παραγωγής H<sub>2</sub> από τους λειχήνες, μετά από την επώαση τους σε ακραίες εντάσεις UVB ακτινοβολίας, ελέγχθηκε με Αέρια Χρωματογραφία Θερμικής Αγωγιμότητας GC-TCD (Hewlett Packard 5890 Series II), με φέρον αέριο αργό υπό πίεση 5bar. Ταυτόχρονα, έγινε ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός και του O<sub>2</sub> που υπάρχει στο δείγμα. Ο διαχωρισμός των αερίων γίνεται βάσει της διαφορετικής θερμικής αγωγιμότητάς τους. Η θερμοκρασία του TCD ανιχνευτή ήταν 200°C, του φούρνου 120°C και του σημείου ένεσης 180°C. Η ποσοτικοποίηση του H<sub>2</sub> και του O<sub>2</sub> έγινε με καμπύλες αναφοράς που σχηματίστηκαν με βάση γνωστές συγκεντρώσεις H<sub>2</sub> και O<sub>2</sub>. Τα δείγματα που ελέγχθηκαν για την παραγωγή H<sub>2</sub> μπήκαν σε μπουκάλια, συνολικού όγκου 120mL, με 20mL H<sub>2</sub>O και έκλεισαν ερμητικά με septum (Εικόνα 2.6). Πραγματοποιήθηκαν τρεις μετρήσεις, η μία με την έναρξη της επώασης (0 μέρες), η δεύτερη μετά από 3 μέρες και η τρίτη μετά από 6 μέρες επώαση.



**Εικόνα 2.6:** Δείγματα λειχήνων σε κλειστά μπουκάλια για τον έλεγχο της παραγωγής υδρογόνου.

#### 3.Αποτελέσματα

# 3.1 Έλεγχος ανθεκτικότητας του λειχήνα σε ακραία UVB ακτινοβολία

Για τον έλεγχο της ανθεκτικότητας του λειχήνα σε υψηλά επίπεδα UVB ακτινοβολίας χρησιμοποιήθηκε αφυδατωμένος λειχήνας ο οποίος εκτέθηκε σε ακραία UVB ακτινοβολία (1,7 mW/cm<sup>2</sup> = 1000 J/m<sup>2</sup>.min). Μετά την έκθεση του λειχήνα σε UVB για 4 ώρες (240 KJ/m<sup>2</sup>), 20 ώρες (1200 KJ/m<sup>2</sup>) και 70 ώρες (4200 KJ/m<sup>2</sup>) (χειρισμοί: UVB4h, UVB20h, UVB70h) έγινε προσπάθεια αναγέννησης. Στην παρούσα εργασία το επίπεδο αναγέννησης του λειχήνα έγινε με την καταγραφή της μοριακής δομής και λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Οι εν λόγω μετρήσεις έγιναν για τους χειρισμούς Control, UVB4h, UVB20h και UVB70h με την χρήση τεχνικών επαγωγικού φθορισμού. Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 3.1) φαίνονται οι καμπύλες του επαγωγικού φθορισμού για τον κάθε χειρισμό μετά από 48ώρες αναγέννηση. Κάθε καμπύλη ακολουθεί το χαρακτηριστικό σχήμα (OJIP καμπύλη), που υποδηλώνει την καλή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού σε όλους ανεξαιρέτως τους χειρισμούς.





Επιπροσθέτως, οι μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού δίνουν πληροφορίες για μια σειρά παραμέτρους, οι οποίες αντικατοπτρίζουν την κατάσταση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού και κατ' επέκταση τη βιωσιμότητα του λειχήνα. Για όλους του παραπάνω χειρισμούς παρατίθεται ένα γράφημα με επιλεγμένες παραμέτρους που προέκυψαν από τις μετρήσεις του επαγωγικού φθορισμού (Εικόνα 3.2). Το Control χρησιμοποιήθηκε ως χειρισμός ελέγχου.





Επιπλέον παρουσιάζονται συγκριτικά σχεδιαγράμματα με όλες τις επιμέρους παραμέτρους (Εικόνα 3.3 – 3.11). Η τιμή 0 κατά την έναρξη της αναγέννησης σε όλες τις παραμέτρους είναι σχετική γιατί ουσιαστικά δεν είναι μετρήσιμη.

Οι παράμετροι που επιλέχτηκαν να μελετηθούν λεπτομερέστερα είναι ο λόγος ABS/RC, που αντιστοιχεί στο μέγεθος της λειτουργικής φωτοσυλλεκτικής κεραίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, ο λόγος RC/CSo, που αναφέρεται στην πυκνότητα των ενεργών κέντρων αντίδρασης, η παράμετρος PSIo, που συνδέεται με τη πρωτογενή φωτοχημεία του συστήματος, ο λόγος DIo/RC, που συνδέεται με την ενέργεια που διαχέεται μη φωτοχημικά από τα ενεργά κέντρα, ο λόγος ETo/RC, που εκφράζει την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων ανά κέντρο αντίδρασης, η παράμετρος SFI<sub>(ABS)</sub> η οποία ουσιαστικά εκφράζει τον δείκτη λειτουργικότητας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, η παράμετρος PI<sub>(ABS)</sub> και ο λόγος Fv/Fm, που αναφέρονται στην απόδοση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (Εικόνες 3.3-3.11).



**Εικόνα 3.3:** Διαφοροποίηση της απόδοσης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (Fv/Fm) κατά την διάρκεια της 48ωρης αναγέννησης σε όλους τους χειρισμούς.



**Εικόνα 3.4:** Κινητική της διαφοροποίησης της πυκνότητας των ενεργών κέντρων αντίδρασης (RC/CSo) για τους χειρισμούς Control, UVB4h ,UVB20h, UVB70h κατά την διάρκεια της 48ωρης αναγέννησης τους.



**Εικόνα 3.5:** Διαφοροποίηση του μεγέθους της λειτουργικής φωτοσυνθετικής κεραίας (ABS/RC) για τους χειρισμούς Control, UVB4h ,UVB20h, UVB70h κατά την διάρκεια της 48ωρης αναγέννησης τους.



**Εικόνα 3.6:** Διαφοροποίηση της πρωτογενούς φωτοχημείας (PSIo) για τους χειρισμούς Control, UVB4h ,UVB20h, UVB70h κατά την διάρκεια της 48ωρης αναγέννησης τους.



**Εικόνα 3.7:** Διαφοροποίηση της μη φωτοχημικά διαχεόμενης ενέργειας ανά ενεργό κέντρο (DIo/RC) για τους χειρισμούς κατά την διάρκεια της 48ωρης αναγέννησης τους.



**Εικόνα 3.8:** Διαφοροποίηση της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων ανά κέντρο αντίδρασης (ETo/RC) για όλους τους χειρισμούς κατά την διάρκεια της 48ωρης αναγέννησης τους.



Εικόνα 3.9: Διαφοροποίηση του αριθμού των οξειδωαναγωγικών κύκλων του Q<sub>A</sub> (Sm) για όλους τους χειρισμούς κατά την διάρκεια της 48ωρης αναγέννησης των λειχήνων.



**Εικόνα 3.10:** Διαφοροποίηση του δείκτη λειτουργικότητας  $(SFI_{(abs)})$  για όλουςτους χειρισμούς κατά την διάρκεια της 48ωρης αναγέννησης των λειχήνων.



**Εικόνα 3.11:** Διαφοροποίηση της απόδοσης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (PI<sub>(abs)</sub>) για όλους τους χειρισμούς κατά την διάρκεια της 48ωρης αναγέννησης των λειχήνων.

Η εικόνα που επικρατεί σε όλα τα σχεδιαγράμματα είναι ότι οι UVB χειρισμοί UVB4h, UVB20h και UVB70h δεν διαφοροποιούνται ουσιαστικά σε σχέση με το control, δηλαδή η έκθεση του λειχήνα σε ακραία UVB ακτινοβολία δεν επηρέασε τον φωτοσυνθετικό μηχανισμό.

## 3.2 Δυνατότητα παραγωγής υδρογόνου από τον λειχήνα μετά την έκθεση του σε ακραία UVB ακτινοβολία

Τα μέχρι τώρα αποτελέσματα δείχνουν ότι ο λειχήνα Pleurosticta acetabulum φάνηκε να είναι ανθεκτικός σε ακραία UVB ακτινοβολία. Επίσης έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να παράγει υδρογόνο όταν βρεθεί σε κλειστό σύστημα και δημιουργήσει ανοξικές συνθήκες (Papazi et al. 2015). Η ικανότητα αυτή οφείλεται στο γεγονός ότι σε ένα κλειστό σύστημα ο μυκοβιώτης (μύκητας), καταναλώνει το οξυγόνο μέσω της αναπνευστικής διαδικασίας και δημιουργεί σύντομα ανοξικό περιβάλλον που απαιτείται για την ενεργοποίηση του ενζύμου της υδρογενάσης στον άλλο συμβιώτη, το μονοκύτταρο χλωροφύκος του γένους *Trebouxia*. Η σύνθεση μοριακού υδρογόνου (H<sub>2</sub>) πραγματοποιείται με το μηχανισμό της dark fermentation (Papazi et al., 2015). Στην παρούσα εργασία θέλαμε να δούμε αν ο λειχήνας διατηρεί την ικανότητα του να παράγει H<sub>2</sub> και μετά την έκθεση του στις ακραίες εντάσεις UVB ακτινοβολίας που εξετάσαμε παραπάνω. Ο έλεγχος για την παραγωγή υδρογόνου έγινε σε πειράματα διάρκειας έξι ημερών. Η ποσοτικοποίηση των δύο αερίων, του υδρογόνου και του οξυγόνου, έγινε μέσω αέριας χρωματογραφίας θερμικής αγωγιμότητας (GC-TCD). Στα παρακάτω γραφήματα φαίνεται συγκριτικά η παραγωγή H<sub>2</sub> στους αναγεννημένους λειχήνες μετά από τους χειρισμούς Control, UVB4h, UVB20h και UVB70h. Η πρώτη μέτρηση έγινε με την έναρξη της επώασης σε κλειστό σύστημα (0 ημέρες), η δεύτερη μετά από 3 ημέρες και η τρίτη μετά από 6 ημέρες επώαση (Εικόνα 3.12).

Στην εικόνα 3.12 παρουσιάζονται τα GC-προφίλ της ανάλυσης των αερίων όπου φαίνεται η διαφοροποίηση του επιπέδου της παραγωγής υδρογόνου και της κατανάλωσης οξυγόνου για όλους τους χειρισμούς (Control , UVB4h ,UVB20h και UVB70h). Ήδη από την πρώτη ημέρα παρατηρείται μία δραματική μείωση οξυγόνου και αυτό επιτρέπει την επαγωγή της υδρογενάσης και κατά συνέπεια την μεγάλη παραγωγή μοριακού υδρογόνου. Σε όλους τους χειρισμούς δεν παρατηρείται ουσιαστική διαφορά στην παραγόμενη ποσότητα υδρογόνου συγκριτικά με τον χειρισμό μάρτυρα (Control) και την έκτη μέρα επώασης σε κλειστό σύστημα η ποσότητα του υδρογόνου σε όλους τους χειρισμούς είναι παρόμοια, παρά την ετερογένεια των λειχήνων που χρησιμοποιήθηκε. Αυτό σημαίνει ότι ο λειχήνας δεν έχει απλώς αντέξει τις ακραίες συνθήκες UVB καταπόνησης, αλλά μετά την UVB καταπόνηση διατηρεί πλήρως και την δυνατότητα του να παράγει υδρογόνο, μάλιστα χωρίς την εξωγενή προσθήκη οποιασδήποτε οργανικής ύλης.



Εικόνα 3.12:Τα GC-προφίλ όλων των χειρισμών (Control, UVB4h, UVB20h και UVB70h) μετά από 0, 3 και 6 ημέρες επώαση σε κλειστό σύστημα. Οι κορυφές που προκύπτουν αντιστοιχούν με τη σειρά σε υδρογόνο (H<sub>2</sub>), οξυγόνο (O<sub>2</sub>) και άζωτο (N<sub>2</sub>).

# 3.3 Έλεγχος ανθεκτικότητας αναγεννημένου λειχήνα σε υψηλά επίπεδα UVB ακτινοβολίας

Εφόσον διαπιστώθηκε πως ο λειχήνας είναι ανθεκτικός σε ακραία UVB ακτινοβολία όταν είναι σε αφυδατωμένη κατάσταση, δοκιμάστηκε και η ανθεκτικότητα του αναγεννημένου σε νερό λειχήνα (μεταβολικά ενεργός λειχήνας) σε ακραία UVB ακτινοβολία. Πιο συγκεκριμένα δείγμα λειχήνα που είχε αναγεννηθεί για 48 ώρες σε νερό εκτέθηκε στην UVB ακτινοβολία (1,7 mW/cm<sup>2</sup> = 1000 J/m<sup>2</sup>.min) για 20 ώρες (1200 KJ/m<sup>2</sup>) (χειρισμός RUVB20h). Και σε αυτήν την περίπτωση πραγματοποιήθηκε μέτρηση επαγωγικού φθορισμού, όπως παραπάνω για διάστημα 48 ωρών αμέσως μετά την έκθεση σε UVB ακτινοβολία. Στην εικόνα 3.13 φαίνονται οι καμπύλες του επαγωγικού φθορισμού. Η καμπύλη του χειρισμού μάρτυρα (Control) που ακολουθεί το χαρακτηριστικό σχήμα (OJIP καμπύλη), υποδηλώνει την καλή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμός έχει καταπονηθεί, αλλά δεν έχει καταρρεύσει (Εικόνα 3.13).



**Εικόνα 3.13:** Καμπύλες επαγωγικού φθορισμού του χειρισμού RUVB20h σε σύγκριση με τον μάρτυρα (control) μετά από αναγέννηση 48 ωρών.

Επιπροσθέτως, οι μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού δίνουν πληροφορίες για μια σειρά παραμέτρους, οι οποίες αντικατοπτρίζουν την κατάσταση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού και κατ' επέκταση του χλωροφύκους. Για τον χειρισμό RUVB20h παρατίθεται ένα αραχνοειδές γράφημα και ένα διάγραμμα με όλες τις κύριες παραμέτρους που προέκυψαν από τις μετρήσεις του επαγωγικού φθορισμού (Εικόνα 3.14) σε σύγκρισή με τον μάρτυρα (Control). Στο αραχνοειδές γράφημα φαίνεται σχηματικά και στο διάγραμμα επακριβώς πώς μεταβάλλονται οι επιμέρους παράμετροι που αφορούν τη μοριακή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού στον χειρισμό RUVB20h συγκριτικά με το χειρισμό ελέγχου (Control).



**Εικόνα 3.14:** Αραχνοειδές γράφημα (επάνω) και διάγραμμα (κάτω) με επιλεγμένες μεταβλητές του OJIP-test για τους χειρισμούς Control και RUVB70h μετά από 48 ώρες αναγέννησης.



Στην συνέχεια παρουσιάζονται συγκριτικά σχεδιαγράμματα της διαφοροποίησης των επιμέρους παραμέτρων κατά τη διάρκεια της 48 ώρης αναγέννησης (Εικόνα 3.15).







RUVB20h







Control







Εικόνα 3.15: Διαφοροποιήσεις των επιλεγμένων παραμέτρων του ΟJIP test για τον χειρισμό RUVB20h συγκριτικά με το control κατά τη διάρκεια της 48ωρης αναγέννησης τους. Ο λόγος Fv/Fm, εκφράζει την απόδοση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Ο λόγος RC/CSo εκφράζει την πυκνότητα των ενεργών κέντρων αντίδρασης. Ο λόγος ABS/RC αντιπροσωπεύει το μέγεθος της λειτουργικής φωτοσυλλεκτικής κεραίας. Η παράμετρος PSIo εκφράζει την πρωτογενή φωτοχημεία του συστήματος. Ο λόγος ETo/RC συνδέεται με την ενέργεια που διαχέεται μη φωτοχημικά από τα ενεργά κέντρα. Ο λόγος ETo/RC εκφράζει την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων ανά λειτουργικό κέντρο αντίδρασης. Η παράμετρος Sm αποτελεί μέτρο του αριθμού των οξειδοαναγωγικών κύκλων του Q<sub>A</sub>. Η παράμετρος PI(abs) είναι ο δείκτης λειτουργικότητας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού.

Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.15 για τον χειρισμό RUVB20h φαίνεται να αυξάνεται το μέγεθος της φωτοσυλλεκτικής κεραίας (ABS/RC) και να μειώνεται η πυκνότητα των ενεργών κέντρων αντίδρασης (RC/CS) με αποτέλεσμα την αύξηση της ενέργειας που διαγέεται μη φωτογημικά (DIo/RC). Αυτό οδηγεί σε μείωση της πρωτογενούς φωτοχημείας (PSIo) και μείωση της ροής ηλεκτρονίων που μεταφέρονται από τα κέντρα αντίδρασης του φωτοσυνθετικού μηγανισμού (ΕΤο/RC). Συνέπεια όλων αυτών τελικά είναι η μείωση της φωτοσυνθετικής απόδοσης, όπως φαίνεται από τη μείωση των PI(abs) και Fv/Fm. Όλα τα παραπάνω παρουσιάζουν μια κλασική εικόνα καταπόνησης για το χειρισμό RUVB20h σε σχέση με τον χειρισμό μάρτυρα χωρίς όμως να καταστρέψουν τον φωτοσυνθετικό μηχανισμό. Οι δείκτες της γενικής λειτουργικής κατάστασης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, SFI(abs) και PI(abs), όσον αφορά τον γειρισμό RUVB20h δείγνουν μία συνεγή αύξηση στη διάρκεια της 48ωρης πλησιάζοντας τις αντίστοιχες μάρτυρα, αναγέννησης τιμές του χειρισμού υποδηλώνοντας βαθμιαία αναβάθμιση μία προσαρμογή συνεγή και του φωτοσυνθετικού μηγανισμού στις νέες συνθήκες (Εικόνα 3.15).

# 3.4 Δυνατότητα παραγωγής υδρογόνου από τον αναγεννημένο λειχήνα μετά την έκθεση του σε ακραία UVB ακτινοβολία

Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός του λειχήνα *Pleurosticta acetabulum* έχει καταπονηθεί, αλλά δεν έχει εξασθενήσει πλήρως, όταν αυτός εκτέθηκε σε ακραία UVB ακτινοβολία αφού πρώτα είχε υποστεί αναγέννηση (RUVB20h). Επίσης, όπως προαναφέρθηκε, έχει αποδειχθεί ότι ο λειχήνας μπορεί να παράγει υδρογόνο φωτοσυνθετικά, όταν βρεθεί σε κλειστό σύστημα και να δημιουργήσει ανοξικές συνθήκες (Papazi et al., 2015). Οπότε θέλαμε να δούμε αν ο αναγεννημένος λειχήνας, παρά την καταπόνηση του, διατηρεί την ικανότητα του να παράγει H<sub>2</sub> και μετά από αυτόν τον χειρισμό (RUVB20h). Ο έλεγχος για την παραγωγή υδρογόνου έγινε με πειράματα διάρκειας έξι ημερών. Η ποσοτικοποίηση των δύο αερίων, του υδρογόνου και του οξυγόνου, έγινε μέσω αέριας χρωματογραφίας θερμικής αγωγιμότητας (GC-TCD). Στα παρακάτω γραφήματα (GC-profiles) φαίνεται συγκριτικά η παραγωγή H<sub>2</sub> στα δείγματα Control και RUVB20h. Η πρώτη μέτρηση είναι το σημείο εκκίνηση (0 ημέρες), η δεύτερη μετά από 3 ημέρες και η τρίτη μετά από 6 ημέρες επώαση σε κλειστό σύστημα όπως περιγράφεται στην ενότητα των Υλικών και Μεθόδων (Εικόνα 3.16).

Στην Εικόνα 3.16 φαίνονται τα επίπεδα παραγωγής υδρογόνου και κατανάλωσης οξυγόνου για τους χειρισμούς Control και RUVB20h. Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι ο αναγεννημένος λειχήνας που εκτέθηκε σε ακραία UVB ακτινοβολία διατήρησε την ικανότητα του να παράγει υδρογόνο όταν βρεθεί σε κλειστό σύστημα όπως και στον χειρισμό Control. Ήδη από την τρίτη ημέρα παρατηρείται μία δραματική μείωση οξυγόνου και αυτό επιτρέπει την επαγωγή της υδρογενάσης και κατα συνέπεια την μεγάλη παραγωγή μοριακού υδρογόνου. Φυσικά η καταπόνηση που είχε καταγραφεί στον λειχήνα του χειρισμού RUVB20h (Εικόνα 3.15), είχε ως αποτέλεσμα την οριακά μικρότερη παραγωγή H<sub>2</sub> (10-20%) σε σχέση με τον χειρισμό του μάρτυρα (Control) (Εικόνα 3.16).



Εικόνα 3.16: GC-προφίλ των χειρισμών Control και RUVB20h, μετά από 0, 3 και 6 ημέρες επώαση σε κλειστό σύστημα. Οι κορυφές που προκύπτουν αντιστοιχούν με τη σειρά σε υδρογόνο (H<sub>2</sub>), οξυγόνο (O<sub>2</sub>) και άζωτο (N<sub>2</sub>).

# 3.5 Έλεγχος ανθεκτικότητας του λειχήνα σε ακραία UVB ακτινοβολία σε συνδυασμό με ακραίες θερμοκρασίες

Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν πως ο λειχήνας Pleurosticta acetabulum μπορεί και επιβιώνει μετά την έκθεση του σε υψηλήω ένταση UVB ακτινοβολία. Επίσης σε πρόσφατη έρευνα αποδείχθηκε πως ο λειχήνας Pleurosticta acetabulum μπορεί να επιβιώσει σε ακραίες θερμοκρασίες (-196°C) διατηρώντας την ικανότητα του να παράγει υδρογόνο (Parasyri et al. 2018). Σε πρόσφατα πειράματα του εργαστηρίου (Πτυχιακή Εργασία Γεράσιμου Τζίβρα που βρίσκεται σε εξέλιξη) δοκιμάζοντας τα όρια του λειχήνα Pleurosticta acetabulum βρέθηκε πως μετά από πλήρη αφυδάτωση που προκαλείται από έκθεση του λειχήνα σε κενό, μπορεί να αντέχει από τους -196°C μέχρι και τους +70°C. Για να δοκιμάσουμε ακόμα περισσότερο την πολύ-ακραιόφιλη συμπεριφορά του λειχήνα ελέγξαμε την βιωσιμότητα του σε συνδυάζοντας την έκθεση

του σε κενό, ακραίες θερμοκρασίες (-196°C και +70°C) και ακραία UVB ακτινοβολία 1,7 mW/cm<sup>2</sup> για 70 ώρες (4200 KJ/m<sup>2</sup>).

Σε αυτή την περίπτωση, δείγματα αφυδατωμένου λειχήνα που εκτέθηκαν για 70 ώρες σε UVB ακτινοβολία (1,7 mW/cm<sup>2</sup>), τοποθετήθηκαν σε συνθήκες κενού για 24 ώρες στην συνέχεια το ένα δείγμα τοποθετήθηκε σε φούρνο (+70°C) για μία ώρα (χειρισμός UVB70h/+70°C) και το άλλο επωάστηκε σε υγρό άζωτο(-196°C) για μία ώρα (χειρισμός UVB70h/-196°C). Τέλος έγινε προσπάθεια αναγέννησης των λειχήνων για 48 ώρες (όπως και στα προηγούμενα πειράματα) και πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού για να ελεγχθεί η κατάσταση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού και κατ' επέκταση του λειχήνα. Στην παρακάτω Εικόνα 3.17 φαίνονται οι καμπύλες του επαγωγικού φθορισμού μετά από την 48ωρη αναγέννηση των λειχήνων. Η καμπύλη του χειρισμού μάρτυρα (Control) που ακολουθεί το χαρακτηριστικό σχήμα (OJIP καμπύλη), υποδηλώνει την καλή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού και οι χειρισμοί UVB70h/+70°C και UVB70h/-196°C συγκρίνονται με αυτόν, παρόλο που στον χειρισμό UVB70h/+70οC διαφαίνεται μικρή καταπόνηση.



Εικόνα 3.17: Καμπύλες επαγωγικού φθορισμού για του χειρισμούς UVB70h/+70oC και UVB70h/-196oC συγκριτικά με το χειρισμό μάρτυρα (Control) μετά από 48ωρη αναγέννηση των λειχήνων.



Εικόνα 3.18:Διαφοροποιήσεις επιλεγμένων μεταβλητών του OJIP-test για τους χειρισμούς Control, UVB70h/+70°C και UVB70h/-196°C μετά από 48 ώρες αναγέννησης.

Οι παράμετροι που επιλέχτηκαν να μελετηθούν λεπτομερέστερα και σε αυτούς τους χειρισμούς είναι ο λόγος ABS/RC, που αντιστοιχεί στο μέγεθος της λειτουργικής φωτοσυλλεκτικής κεραίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, ο λόγος RC/CSo, που αναφέρεται στην πυκνότητα των ενεργών κέντρων αντίδρασης, η παράμετρος PSIo, που συνδέεται με τη πρωτογενή φωτοχημεία του συστήματος, ο λόγος DIo/RC, που συνδέεται με την ενέργεια που διαγέεται μη φωτογημικά από τα ενεργά κέντρα, ο λόγος ΕΤο/RC, που εκφράζει την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων ανά κέντρο αντίδρασης, η παράμετρος Sm που αποτελεί μέτρο του αριθμού των οξειδοαναγωγικών κύκλων της QA, η παράμετρος SFI(ABS) η οποία ουσιαστικά εκφράζει τον δείκτη λειτουργικότητας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, η παράμετρος PI(ABS) και ο λόγος Fv/Fm, που αναφέρονται στην απόδοση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (Εικόνα 3.18). Όπως φαίνεται και στο παραπάνω διάγραμμα (εικόνα 3.18) για τον χειρισμό UVB70h/+70°C φαίνεται να αυξάνεται το μέγεθος της φωτοσυλλεκτικής κεραίας (ABS/RC), με αποτέλεσμα την αύξηση της ενέργειας που διαγέεται μη φωτοχημικά (DIo/RC). Αυτό οδηγεί σε μείωση της πρωτογενούς φωτοχημείας (PSIo) και μείωση της ροής ηλεκτρονίων που μεταφέρονται από τα κέντρα αντίδρασης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (ΕΤο/RC). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τελικά να μειώνεται η φωτοσυνθετική απόδοση, όπως φαίνεται



από τη μείωση των PI(abs) και Fv/Fm συγκριτικά με τις αντίστοιχες τιμές του control.



**Εικόνα 3.19**: Διαφοροποιήσεις των επιλεγμένων παραμέτρων του OJIP test για τους χειρισμούς Control, UVB70h/+70°C και UVB70h/-196°C κατά τη διάρκεια της 48ωρης αναγέννησης τους. Για λεπτομερή περιγραφή των παραμέτρων βλ. λεζάντα Εικόνας 3.15.

Όλα τα παραπάνω παρουσιάζουν μια εικόνα μερικής καταπόνησης για το χειρισμό UVB70h/+70°C, η τιμή Fv/Fm δείχνει ότι ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός έχει ελαφρώς καταπονηθεί και πως ο οργανισμός μπορεί να επανέλθει μετά από την συγκεκριμένη σειρά καταπονήσεων. Οι δείκτες της γενικής λειτουργικής κατάστασης του

φωτοσυνθετικού μηχανισμού, Fv/Fm, SFI(abs) και PI(abs), όσον αφορά τον χειρισμό UVB70h/+70°C δείχνουν μία συνεχή αύξηση στη διάρκεια της 48ωρης αναγέννησης πλησιάζοντας τις αντίστοιχες τιμές του χειρισμού μάρτυρα, υποδηλώνοντας μία βαθμιαία προσαρμογή και συνεχή αναβάθμιση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού που τελικά πλησιάζει τις τιμές του control (Εικόνα 3.19).

Όπως φαίνεται και στο παραπάνω διάγραμμα (Εικόνα 3. 19) για τον χειρισμό UVB70h/-196°C οι τιμές όλων των παραμέτρων του OJIP-test δεν διαφοροποιούνται ουσιαστικά σε σχέση με το control, δηλαδή η έκθεση του λειχήνα σε UVB ακτινοβολία, κενό και θερμοκρασία -196 °C δεν επηρέασε στο παραμικρό τη λειτουργικότητα του λειχήνα.

# 3.6 Δυνατότητα παραγωγής υδρογόνου από λειχήνες που εκτέθηκαν σε ακραία UVB ακτινοβολία και ακραίες θερμοκρασίες

Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός του λειχήνα *Pleurosticta acetabulum* έχει παρουσιάσει ενδείξεις περιορισμένης καταπόνησης κατά την συνδυαστική έκθεση σε ακραία UVB ακτινοβολία, κενό και σε υψηλή θερμοκρασία +70°C στον χειρισμό UVB70/+70 °C παραμένοντας απολύτως λειτουργικός. Στην περίπτωση του χειρισμού UVB70/-196°C η λειτουργία του φωτοσυνθετικού οργανισμού δεν έχει επηρεαστεί καθόλου. Ο έλεγχος για την παραγωγή H<sub>2</sub> στους δύο αυτούς συνδυαστικούς χειρισμούς (UVB70/+70 °C, UVB70/-196°C) είναι ο ίδιος με τους προηγούμενους και τα αποτελέσματα φαίνονται παρακάτω (Εικόνα 3.20).

Στην Εικόνα 3.20 φαίνεται ξεκάθαρα ότι όλοι οι χειρισμοί (Control , UVB70/+70 °C και UVB70/-196°C) παράγουν H<sub>2</sub>. Στον χειρισμό UVB70/+70 °C συγκριτικά με το Control την έκτη μέρα επώασης, η ποσότητα του υδρογόνου φαίνεται να έχει μία μικρή απόκλιση, πιθανόν λόγω της καταπόνησης που υπέστη ο λειχήνας σε αυτή την ακραία θερμοκρασία. Ωστόσο στον χειρισμό UVB70/-196°C συγκριτικά με το Control την έκτη μέρα η ποσότητα του υδρογόνου είναι ίδια. Αυτό σημαίνει ότι ο οργανισμός δεν έχει χάσει την ικανότητα παραγωγής H<sub>2</sub> μετά την συνδυαστική έκθεσή του σε ακραίες συνθήκες UVB ακτινοβολίας, κενού και ακραίας θερμοκρασίας.



Εικόνα 3.20: GC-προφίλ των χειρισμών (Control, UVB70/+70 °C και UVB70/-196°C) μετά από 0, 3 και 6 ημέρες επώαση σε κλειστό σύστημα. Οι κορυφές που προκύπτουν αντιστοιχούν με τη σειρά σε υδρογόνο (H<sub>2</sub>), οξυγόνο (O<sub>2</sub>) και άζωτο (N<sub>2</sub>).

# 3.7 Έκθεση μονοκύτταρων χλωροφυκών σε ξηρασία και υψηλής έντασης UVB ακτινοβολία

Τα δεδομένα που προκύπτουν από την παρούσα εργασία μέχρι στιγμής δείχνουν ότι ο λειχήνας είναι ένα ιδιαίτερο μικρο-οικοσύστημα, στο οποίο ένας μύκητας και ένα μονοκύτταρο χλωροφύκος συμβιώνουν τέλεια και ανταπεξέρχονται σε ακραίες συνθήκες καταπόνησης. Το ερώτημα που προκύπτει είναι αν η συμβίωση είναι υπεύθυνη για αυτήν την ακραιόφιλη συμπεριφορά του λειχήνα. Για να απαντηθεί αυτό το ερώτημα πραγματοποιήθηκαν συγκριτικά πειράματα για τα μονοκύτταρα χλωροφύκη *Scenedesmus obliquus* και *Chlorella vulgaris* ώστε να ελεγχθεί η βιωσιμότητά τους σε αυτές τις συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για τον λειχήνα.

Δείγμα υγρής καλλιέργεια των δύο μονοκύτταρων γλωροφυκών μεταφέρθηκε σε χάρτινο φίλτρο που εκτέθηκε σε φυσική ροή αέρα για 48 ώρες έως την πλήρη αποξήρανση του (Sc.o\_Dry και Ch.v\_Dry). Στη συνέχεια εκτέθηκε σε υψηλής έντασης UVB ακτινοβολίας  $1,7 \text{mW/cm}^2$  για 20 ώρες (χειρισμοί: Sc.o\_Dry/UVB20 και Ch.v\_Dry/UVB20). Η προσπάθεια για λειτουργική επαναφορά του ακινητοποιημένου χλωροφύκους πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου και επώαση σε κατάλληλο υγρό θρεπτικό μέσο. Ως χειρισμός ελέγχου χρησιμοποιήθηκε δείγμα υγρής καλλιέργειας (Sc.o\_Control και Ch.v\_Control). Σε κάθε χειρισμό έγινε μέτρηση επαγωγικού φθορισμού για να εκτιμηθεί αν επηρεάζεται η λειτουργικότητα του φωτοσυνθετικού μηγανισμού και κατ' επέκταση η ανθεκτικότητα του κυττάρου. Τα αποτελέσματα φαίνονται στις Εικόνες 3.21 και 3.22, όπου οι χειρισμοί ελέγχου (Sc.o\_Control και Ch.v\_Control) παρουσιάζουν μία καμπύλη που ακολουθεί το χαρακτηριστικό σχήμα (OJIP καμπύλη), που υποδηλώνει την καλή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Τόσο οι χειρισμοί Sc.o\_Dry και Ch.v\_Dry, όσο και οι χειρισμοί Sc.o\_Dry/UVB20 και Ch.v\_Dry/UVB20 μετά από 48ωρη προσπάθεια αναγέννησης, έδειξαν ότι δεν μπόρεσαν να επιβιώσουν και να αναγεννηθούν (Εικόνα 3.21 και 3.22).

Scenedesmus obliquus



**Εικόνα 3.21:** Καμπύλες επαγωγικού φθορισμού για του χειρισμούς Sc.o\_Control, Sc.o\_Dry και Sc.o\_Dry/UVB20 μετά από 48ωρη αναγέννηση τους.



**Εικόνα 3.22:** Καμπύλες επαγωγικού φθορισμού για του χειρισμούς Ch.v\_Control, Ch.v\_Dry και Ch.v\_Dry/UVB20 μετά από 48ωρη αναγέννηση τους.

Και στις δύο περιπτώσεις φαίνεται ξεκάθαρα ότι τα ελεύθερα δεν αντέχουν ούτε την ξηρασία αλλά ούτε την έκθεση σε ακραία UVB ακτινοβολία (Εικόνες 3.21 και 3.22). Αυτό αποδεικνύει για άλλη μια φορά την ιδιαίτερη ικανότητα του λειχήνα ως μικροοικοσύστημα να επιβιώνει σε ακραίες συνθήκες απόλυτης ξηρασίας και ακραίας UVB ακτινοβολίας και να μπορεί στη συνέχεια να χρησιμοποιηθεί για βιοτεχνολογικές εφαρμογές (παραγωγή H<sub>2</sub>).

## 4. Συζήτηση

Όλες οι πειραματικές προσεγγίσεις στα πλαίσια της παρούσας εργασίας εστιάζουν σε έναν ιδιαίτερο μικρο-οικοσύστημα, τους λειχήνες. Ένας μύκητας και, στη συγκεκριμένη περίπτωση, ένα μονοκύτταρο γλωροφύκος (Honegger 1998), συμβιώνουν σε αρμονία και όλοι επωφελούνται από αυτή τη συμβίωση (Smith et al. 1969). Ο μύκητας προσφέρει ένα μικροπεριβάλλον στους συμβιώτες για την επιβίωση και αναπαραγωγή τους (Wang et al. 2014), ενώ ο φωτοσυνθετικός οργανισμός προσφέρει οργανική ύλη και ενέργεια στο μύκητα για την κάλυψη αναγκών του (Richardson et al. 1968; Komiya and Shibata 1971). Υπάρχουν ορισμένα είδη λειχήνων που διαθέτουν και ένα τρίτο συμβιώτη, ένα ζυμομύκητα, ο ρόλος του οποίου δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί (Spribille et al. 2016). Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η ακραιόφιλη συμπεριφορά του λειχήνα Pleurosticta acetabulum σε ακραία UVB ακτινοβολίας σε κατάστασή αφυδατωμένου και αναγεννημένου λειχήνα, καθώς και σε συνδυασμός με κενό και ακραίες θερμοκρασίες. Επιπλέον, πέρα από την μελέτη ανθεκτικότητας και επιβίωσής του στις εν λόγω συνθήκες, η μελέτη εστιάζει στη δυνατότητα διατήρησης της λειτουργικότητας του οργανισμού και την ικανότητα του να παράγει βιο-υδρογόνο μετά από την έκθεσή του σε αυτές τις ακραίες συνθήκες.

Τα αποτελέσματα έδειξαν πως ο λειχήνας έχει την ικανότητα να επιβιώνει όταν εκτεθεί σε ακραία UVB ακτινοβολία και πως ο φωτοσυνθετικός του μηχανισμός λειτουργεί κανονικά μετά από αναγέννηση σε κανονικές συνθήκες. Αρχικά ο αφυδατωμένος λειχήνας που εκτέθηκε σε συνθήκες ακραίας UVB ακτινοβολίας (1,7 mW/cm<sup>2</sup> = 1000 J/m<sup>2</sup>.min) για για 4ώρες (240 KJ/m<sup>2</sup>), 20ώρες (1200 KJ/m<sup>2</sup>) και 70 ώρες (4200 KJ/m<sup>2</sup>) (χειρισμοί UVB4h, UVB20h, UVB70) δεν παρουσιάζει καμία μετρήσιμη μεταβολική

δραστηριότητα στον φωτοσυνθετικό μηχανισμό. Η καμπύλη φθορισμού και η τιμή της μέγιστης φωτοσυνθετικής απόδοσης, εκφρασμένη ως Fv/Fm, για τους παραπάνω χειρισμούς (UVB4h, UVB20h, UVB70) δείχνουν την πλήρη επαναφορά του φωτοσυνθετικού μηγανισμού και κατ' επέκταση του λειγήνα, δομικά και λειτουργικά. Για να γίνει κατανοητό το επίπεδο της UVB καταπόνησης που ασκήθηκε στον λειγήνα πρέπει να αναφέρουμε ότι το επίπεδο της ηλιακής UVB ακτινοβολίας που μετρήσαμε το μεσημέρι στην Κρήτη ήταν 0.06 mW/cm<sup>2</sup> =  $50 \text{ J/m}^2$ .min. Δηλαδή στις πειραματικές προσεγγίσεις χρησιμοποιήθηκε ένταση UVB ακτινοβολίας υψηλότερη κατά 20 φορές τουλάχιστον από την αντίστοιχη ηλιακή. Επίσης η ηλιακή ένταση UVB ακτινοβολίας αφορά τη μέγιστη τιμή στη διάρκεια της ημέρας, ενώ στις πειραματικές προσεγγίσεις χρησιμοποιήσαμε ακραία UVB ακτινοβολία (1,7 mW/cm<sup>2</sup> = 1000 J/m<sup>2</sup>.min) για μεγάλα χρονικά διαστήματα (4 ώρες, 20 ώρες, 70 ώρες). Ένας επιπλέον επιβαρυντικός παράγοντας κατά τις πειραματικές προσεγγίσεις είναι ότι χρησιμοποιήθηκε ακραία UVB ακτινοβολία απουσία ουσιαστικά ορατής ακτινοβολίας. Είναι γνωστό ότι φωτοπροσαρμογή σε υψηλής έντασης ορατής ακτινοβολία αυξάνει σημαντικά την αντοχή των φυτικών οργανισμών στην UVB ακτινοβολία (Sfichi et al. 2004).

Στην παρούσα εργασία, δεν περιοριστήκαμε μόνο σε πειράματα με αφυδατωμένο λειχήνα, αλλά ελέγχθηκε και η αντοχή του αναγεννημένου (μεταβολικά ενεργού) λειχήνα *Pleurosticta acetabulum* σε ακραία UVB ακτινοβολία. Οι περισσότερες αναφορές για την ακραιόφιλη συμπεριφορά του λειχήνα βασίζονται στην ιδιαιτερότητα να αποβάλλει την υγρασία και να παραμένει σε ανενεργή κατάσταση με αποτέλεσμα να επιβιώνει κάτω από αντίζοες καταστάσεις. Εφόσον διαπιστώσαμε πως ο λειχήνας αντέχει την επίδραση της ακραίας UVB ακτινοβολίας όταν βρίσκεται σε ανενεργή κατάσταση, θέλαμε να διαπιστώσουμε και αν μπορεί να επιβιώσει κάτω από αυτές τις συνθήκες όταν είναι σε πλήρη μεταβολική δραστηριότητα. Σύμφωνα με τις μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού που πραγματοποιήθηκαν στον χειρισμό RUVB70h προκύπτει πως οι τιμές μιας σειράς παραμέτρων που αφορούν στη μοριακή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, υποδηλώνουν την ύπαρξη σοβαρής καταπόνησης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, χωρίς όμως να καταρρεύσει ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός και κατ' επέκταση ο λειχήνας.

Τα πειράματα της παρούσας εργασίας έδειξαν ξεκάθαρα τη δυνατότητα επιβίωσης του αφυδατωμένου λειχήνα *Pleurosticta acetabulum* και μετά από συνδυαστική έκθεσή του σε ακραία UVB ακτινοβολία, κενό και ακραίες θερμοκρασίες (UVB70h/+70°C, UVB70h/-196°C). Σε όλους τους χειρισμούς (απλούς και συνδυαστικούς) φάνηκε

ξεκάθαρα η πολυ-ακραιόφιλη συμπεριφορά του λειχήνα αλλά και η διατήρηση της ικανότητας του να παράγει μεγάλες ποσότητες μοριακού υδρογόνου (H<sub>2</sub>) μόνο με την προσθήκη νερού σε ένα κλειστό σύστημα. Αυτά τα δεδομένα βρίσκονται σε συμφωνία με πρόσφατα δεδομένα του Εργαστηρίου (Parasyri et al. 2018), όπου αποδείχθηκε πως ο λειχήνας *Pleurosticta acetabulum* μπορεί να επιβιώσει υπό την επίδραση ακραίας θερμοκρασίας (-196°C) και διατηρήσει την ικανότητα να παράγει υδρογόνο σε κλειστό σύστημα (Parasyri et al. 2018). Έχει επίσης αποδειχθεί πως οι αφυδατωμένοι λειχήνες μπορούν να ανακάμψουν ακόμη και μετά από 10 χρόνια αδράνειας (Kappen και Valladares 1999; Kappen 2000). Με αυτά τα δεδομένα, ο λειχήνας, όπως έχει ήδη αναφερθεί, είναι ένα ιδιαίτερο μικρο-οικοσύστημα που είναι σε θέση να αποικίσει και να κυριαρχήσει σε εξαιρετικά ακραία περιβάλλοντα, όπως έρημοι ή αρκτικά και αλπικά οικοσυστήματα και αυτό διότι έχουν την ικανότητα να συνθέτουν ενώσεις για να διατηρούν και να προστατεύουν την μεταβολική πλαστικότητα του συστήματος συμβίωση τους από διάφορους αβιοτικούς και βιοτικούς παράγοντες.

Εξαιτίας αυτής της ιδιαιτερότητας των λειχήνων χρησιμοποιήθηκαν ήδη σε κάποιες διαστημικές αποστολές (Sancho et al. 2007; de Vera et al. 2010; Raggio et al. 2011) για να ελεγγθεί η αντογή τους και το ενδεγόμενο επιβίωσής τους σε άλλους πλανήτες. Πράγματι, οι λειχήνες φάνηκαν να αντέχουν σε συνθήκες προσομοίωσης του διαστήματος (de Vera et al. 2002) διατηρώντας την ικανότητα αναπαραγωγής τους (de Vera et al. 2003). Ένα ακόμα πλεονέκτημα που θα είχαν οι λειχήνες σε μία ενδεχόμενη αποστολή αποίκισης άλλου πλανήτη είναι το γεγονός ότι φωτοσυνθέτουν. Οπότε μπορούν να αξιοποιήσουν την ηλιακή ακτινοβολία για να παράγουν οξυγόνο και οργανική ύλη για την επιβίωσή τους, δηλαδή θα ήταν αυτόνομοι. Οι Papazi et al. (2015) έδειξαν για πρώτη φορά, και η παρούσα μελέτη το επιβεβαίωσε, ότι οι λειγήνες είναι σε θέση σε ένα κλειστό σύστημα, να παράγουν μεγάλη ποσότητα μοριακού υδρογόνου φωτοσυνθετικά. Η ικανότητα αυτή οφείλεται στη συμβίωση του μύκητα και του φωτοσυνθετικού οργανισμού. Σε ένα κλειστό σύστημα, ο μύκητας καταναλώνει το οξυγόνο μέσω της αναπνοής, ώστε να δημιουργηθούν οι ανοξικές συνθήκες που χρειάζεται το ένζυμο υδρογενάση για την παραγωγή Η<sub>2</sub>. Επιπλέον, έδειξαν ότι η παραγωγή Η2 είναι πολύ μεγάλη και σχεδόν ισόποση όταν γίνεται στο φως ή στο σκοτάδι (μέσω του μηγανισμού της φωτοανεξάρτητης ζύμωσης – dark fermentation). To H<sub>2</sub> μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια ως καύσιμο και μάλιστα δίνει καλύτερη απόδοση κατά την καύση του σε σχέση με άλλα καύσιμα. Επιπλέον, δεν απελευθερώνει τοξικά παραπροϊόντα (Antal et al., 2011). Το πιο σημαντικό αυτής της προοπτικής

είναι, ότι σε μία μελλοντική διαστημική αποστολή σε άλλο πλανήτη (π.χ. στον Άρη), μπορεί να χρησιμοποιηθεί ο λειχήνας ως πηγή ενέργειας, χωρίς επιπλέον κόστος, όποτε χρειαστεί και η συντήρησή του για πολύ μεγάλα χρονικά διαστήματα είναι εφικτή και χωρίς κόστος, λόγω της σταθερότητάς του σε ανενεργή μορφή, δηλαδή σε κατάσταση ξηρασίας.

Στην παρούσα εργασία έγινε η σύνδεση της συνδυαστικής ακραιοφιλίας των λειχήνων πιθανές βιοτεχνολογικές εφαρμογές. Οι συνδυαστικοί χειρισμοί зц που παρουσιάστηκαν παραπάνω αποδεικνύουν την διατήρηση της ικανότητάς των λειχήνων σε ένα κλειστό σύστημα να δημιουργούν ανοξικές συνθήκες και να παράγουν μεγάλες ποσότητες μοριακού υδρογόνου (H2). Τα επίπεδα H2 δε διαφέρουν ουσιαστικά ανάμεσα στους χειρισμούς, όπως φαίνεται και από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, ακόμα και όταν συνδυάστηκε ακραία UVB ακτινοβολία με ακραίες θερμοκρασίες, αποδεικνύοντας ότι η έκθεση σε ακραίες συνθήκες δεν επηρεάζει την λειτουργικότητα του λειγήνα αλλά ούτε και τη δυνατότητα του να παράγει Η2. Συνοψίζοντας, φαίνεται ότι ο λειχήνας όχι μόνο επιβιώνει σε ακραίες εντάσεις UVB ακτινοβολίας, αλλά διατηρεί την ικανότητα παραγωγής Η<sub>2</sub>, με τη δυνατότητα μελλοντικών βιοτεχνολογικών εφαρμογών ακόμη και σε ακραία περιβάλλοντα άλλων πλανητών, ανοίγοντας το δρόμο για νέες αστροβιολογικές και αστροβιοτεχνολογικές προοπτικές.

## 5. Βιβλιογραφία

- Anna, J.M, Scholes, G.D., van Grondelle, R. A (2013) Little Coherence in Photosynthetic Light Harvesting. *BioScience* 1-12.
- ANPA, 2001. I.B.L Indice di biodiversità lichenica. ANPA, Manuali e linee guida 2/2001, pp 85.
- Allen, J. F. (2003) Cyclic, pseudocyclic and noncyclic photophosphorylation: new links in the chain. *TRENDS in Plant Science* 8:15-19.
- Arnon D.I., MB ALLEN, FR Whatley. (1954) Photosynthesis by isolated chloroplasts. *Nature* 174:394–396.
- Arnon, D.I. (1971). The Light Reactions of Photosynthesis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 68: 2883-2892.
- Ahmadjian, V. (1993). The Lichen Symbiosis. New York: John Wiley.588
- Antal, T.K., Krendeleva, T.E., Rubin, A.B. (2011) Acclimation of green algae to sulfur deficiency: underlying mechanisms and application for hydrogen production. *Appl Microbiol Biotechnol* 89:3–15.
- Arrhenius, S. (1903) Die Verbreitung des Lebens im Weltenraum. Die Umschau 7, 481–485.
- Beckett R. P Kranner, I Minibaueva, F. V (2008). Stress Physiology and the symbiosis. In Nash T.H (ed)Lichen Biology pp 134-151 Cambridge, Cambridge University Press.
- Brodo, I. M., Sharnoff, S. D. and Sharnoff, S. (2001). Lichens of North America. New Haven: Yale University Press.
- Budel, B. (1992) Taxonomy of lichenized procaryotic blue-green algae. In Algae and Symbioses: Plants, Animals, Fungi, Viruses, Interactions Explored (W. Reisser, ed.): 301–324. Bristol: Biopress Ltd.
- Demmig-Adams, B., Maguas, C., Adams W. W., III, et al. (1990). Effect of high light on the efficiency of photochemical energy conversion in a variety of lichen species with green and blue-green phycobionts. Planta, 180, 400–409.
- de Vera, J.-P.P., Horneck, G., Rettberg, P., Ott, S. (2003) The potential of the lichen symbiosis to cope with extreme conditions of outer space – II. germination capacity of lichen ascospores in response to simulated space conditions *Advances in Space Research* 33: 1236–1243.

- de Vera, J.-P.P. (2012) Lichens as survivors in space and on Mars. *Fungal Ecology* 5: 472-479.
- Dubini, A.G., M.L. (2014) Engineering photosynthetic organisms for the production of biohydrogen. *Photosynth Res* .123:241-253.
- Ertl, L. (1951). Uber die Lichtverha<sup>--</sup>ltnisse in Laubflecten. Planta. 39, 245–270.
- Feige GB, Jensen M (1992) Basic carbon and nitrogen metabolism of lichens.
   In: Reisser W (ed) Algae and symbioses: plants, animals, fungi, viruses, interactions explored. Biopress Ltd., Bristol, England, 277-299.
- Florin L, Tsokoglou A, Happe T (2001) A novel type of Fe-hydrogenase in the green alga *Scenedesmus obliquus* is linked to the photosynthetical electron transport chain. J Biol Chem 276:6125–6132.
- Frenkel, A. (1954) Light induced phosphorylation by cell-free preparations of photosynthetic bacteria. *J Am Chem. Soc.* 76:5568–5569.
- Gaffron H (1939) Reduction of CO2 with H2 in green plants. Nature 143: 204–205.
- Graffon H, (1944) Photosynthesis, photoreduction and dark reduction of carbon dioxide in certain algae. Biol Rev Cambridge Phil Soc 19: 1–20.
- Gaffron H, Rubin J (1942) Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae. J Gen Physiol 26: 219–240.
- Ghirardi M.L., Zhang L., Lee J.W., Flynn T., Seibert M., Greenbaum E., Melis A. (2000). Microalgae: a green source of renewable H<sub>2</sub>. Trends Biotechnol. 18: 506–511.
- Govindjee, Shevela, D., & Björn, L. O. (2017). Evolution of the Z-scheme of photosynthesis: a perspective. Photosynthesis Research, 133(1-3), 5–15.
- Hallenbeck PC, Kochian LV, Weissman JC, Benemann JR. Solar energy conversion with hydrogen producing cultures of the blue-green alga, Anabaena cylindrica. Biotech Bioeng Symp 1978; 8:283–98.
- Hemschemeier A, Fouchard S, Cournac L, Peltier G, Happe T (2008) Hydrogen production by *Chlamydomonas reinhardtii*: an elaborate interplay of electron sources and sinks. Planta 227: 397–407.
- Honegger, R. (1998) The lichen symbiosis- What is so spectacular about it? *The Lichenologist* 30: 193–212.
- Horneck G. (2000) The microbial world and the case for Mars. Planetary and Space Science 48: 1053e1063.

- Hsu J. (2014) Lichen on Mars. Astrobiology magazine.
- Kappen, L. (1973). Response to extreme environments. In: V: Ahmadjian & M.
  E. Hale (eds.), The Lichens: 311-380. Academic Press, New York.
- Kappen, L. (2000) Some aspects of the great success of lichens in Antarctica. Antarct. Sci. 12, 314–324.
- Kappen, L., Valladares, F. (2007) Opportunistic growth and desiccation tolerance, the ecological success of poikilohydrous autotrophs. *Functional Plant Ecology*, edited by. F. Pugnaire and F. Valladares, Taylor and Francis, New York, pp 7–65.
- Kirchhoff H. (2019) Chloroplast ultrastructure in plants. New Phytologist 223: 565–574.
- Komiya, T., Shibata, S. (1971) Polyols produced by the cultured phyco- and mycobionts of some Ramalina species. *Phytochemistry* 10: 695-699.
- Kranner, I., Beckett, R., Hochman, A., Nash, T. H. (2008) Desiccation-tolerance in lichens: a review. *The Bryologist* 111: 576–593.
- Kranner, I., Cram, W.J., Zorn, M., Wornik, S., Yoshimura, I., Stabentheiner, E., et al. (2005) Antioxidants and photoprotection in a lichen as compared with its isolated symbiotic partners. *Proc Natl Acad. Sci USA* 102: 3141–3146.
- Lange OL. (1953). Hitze- und Trockenresitenz der Flechten in Beziehung zu ihrer Verbreitung. Flora 140, 39–97.
- Lange O. L., Kilian E. and Ziegler, H. (1986). Water vapor uptake and photosynthesis of lichens: performance differences in species with green and blue-green algae as phycobionts. Oecologia, 71, 104–110.
- Melis A. (2007) Photosynthetic H<sub>2</sub> metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii* (unicellular green algae). Planta 226: 1075–1086.
- Melis, A., Happe, T. (2001) Hydrogen production. Green algae as a source of energy. *Plant Physiol* 127:740–748.
- Melosh HJ, (1988) Nash. The rocky road to panspermia. Nature 332: 687e688.
- Onofri S, Barreca D, Agnoletti A, Rabbow E, Horneck G, de Vera JPP, Selbmann L, Zucconi L, Hatton J, (2008). Resistance of Antarctic black fungi and cryptoendolithic communities to simulated space and Mars conditions. Studies in Mycology 61: 99e109.

- Parasyri A., Papazi A., N. Stamatis, Zerveas S., Avramidou E. V., Doulis A. G., Pirintsos S.and Kotzabasis K. (2018). Lichen as Micro-Ecosystem: Extremophilic Behavior with Astrobiotechnological Applications. Astrobiology 18(12): 1528-1542.
- Papazi A., Kastanaki E., Pirintsos S. and Kotzabasis K. (2015). Lichen Symbiosis: Nature's High Yielding Machines for Induced Hydrogen Production. PLoS ONE 10(3): e0121325.
- Parasyri A., Papazi A., Stamatis N., Zerveas S., Avramidou E. V., Doulis A. G., Pirintsos S. and Kotzabasis K. (2018). Lichen as Micro-Ecosystem: Extremophilic Behavior with Astrobiotechnological Applications. Astrobiology 18(12): 1528-1542.
- Rabbow, E., Rettberg, P., Barczyk, S., Bohmeier, M., Parpart, A., Panitz, C., Horneck, G., von Heise-Rotenburg, R., Hoppenbrouwers, T., Willnecker, R., Baglioni, P., Demets, R., Dettmann, J., and Reitz, G. (2012) EXPOSE-E: an ESA astrobiology mission 1.5 years in space. Astrobiology 12:374–386.
- Raggio J., Pintado A., Ascaso C., De La Torre R., De Los Rı'os A., Wierzchos J., Horneck G. and L.G. Sancho (2011). Whole Lichen Thalli Survive Exposure to Space Conditions: Results of Lithopanspermia Experiment with Aspicilia fruticulose. Astrobiology 11(4) 282-292.
- Rambold G, Triebel D. (1992). The inter-lecanoralean associations. Bibliotheca Lichenologica 48.
- Richardson, D. H. S., Hill, D. J., Smith, D. C. (1968) Lichen physiology. XI. The role of the alga in determining the pattern of carbohydrate movement between lichen symbionts. *New Phytol* 67: 469-486.
- Richter, H. (1865) Zur Darwinschen Lehre. Schmidts Jahrb. Ges. Med. 126, 243–249.
- Sancho, L.G., de la Torre, R., Horneck, G., Ascado, C., de los Rios, A., Pintado, A., Wierzchos, J., Schuster, M. (2007) Lichens Survive in Space: Results from the 2005 LICHENS Experiment. *Astrobiology* 7: 443-454.
- Sfichi L., Ioannidis N., Kotzabasis K. (2004). Thylakoid-associated polyamines adjust the UVB-sensitivity of the photosynthetic apparatus by means of LHCII changes. Photochem. Photobiol. 80: 499-506.

- Smith, D, Muscatine, L, Lewis, D. (1969) Carbohydrate movement from autotrophs to heterotrophs in parasitic and mutualistic symbiosis. *Biol Rev Camb Philos Soc* 44:17-90.
- Spribille, T., Tuovinen, V., Resl, P., Vanderpool, D., Wolinski, H., Aime, M.C., Schneider, K., Stabentheiner, E., Toome-Heller, M., Thor, G., Mayrhofer, H., Johannesson, H., McCutcheon, J.P. (2016): Basidiomycete yeasts in the cortex of ascomycete macrolichens. *Science* 353: 488-492.
- Strasser, B.J., Strasser, R.J., (1995) Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: the JIP-test. In: Mathis P. Photosynthesis: from light to biosphere. Dordrecht: *Kluwer Academic Press* 977–980.
- Tschermak-Woess E. (1988). The algal partner. In CRC Handbook of Lichenology, Vol. 1, ed. M. Galun, pp. 39–92. Boca Raton: CRC Press.
- Tschermak-woess, E. (1989) The Algal Partner. In GALUN M. *CRC Handbook* of *Lichenology* vol. I:39–92. Boca Raton: CRC Press.
- Walker D.A. (2002). The Z-scheme downhill all the way. *Trends Plant Sci.* 7:183–185.
- Wang Y, Zhang X, Zhou O, Zhang X & Wei J.(2014) Comparative transcriptome analysis of the lichen-forming fungus *Endocarpon pusillum* elucidates its drought adaptation mechanisms. *Science China Life Sciences* volume . 58:89–100.
- Werth, S. (2011). Biogeography and phylogeography of lichen fungi and their photobionts Biogeography of Microscopic Organisms: Is Everything Small Everywhere? (pp. 192-207): Cambridge University Press. 55.
- Westall F, Brack A, Hofmann B, Horneck G, Kurat G, Maxwell J, Ori GG, Pillinger C, Raulin F, Thomas N, Fitton B, Clancy P, Prieur D, Vassaux D, (2000). An ESA study for the search for life on Mars. Planetary and Space Science 48: 181e202.
- Zerges, W. (2002) Does complexity constrain organelle evolution? *Trends Plant Sci.* 7:175–182.